

SAP442

Rijksinstituut voor Kust en Zee

Universiteit Antwerpen

100102

**SPECIATIE VAN ORGANISCHE
MICROVERONTREINIGINGEN:
GEVOLGEN VOOR TOXICITEIT
EN NORMSTELLING**

ir. C. Marlé Dr. R. Blust

SAP442

**SPECIATIE VAN ORGANISCHE MICROVERONTREINIGINGEN:
GEVOLGEN VOOR TOXICITEIT EN NORMSTELLING**

Een studie in opdracht van

**MINISTERIE VAN VERKEER EN WATERSTAAT
DIRECTORAAT-GENERAAL RIJKSWATERSTAAT
RIJKSINSTITUUT VOOR KUST EN ZEE/RIKZ
Project RKZ-213, Nummer RIKZ/OSC, 070-3114306**

Dr. A. P. Van Wezel

uitgevoerd door

**UNIVERSITEIT ANTWERPEN
DEPARTEMENT BIOLOGIE
ONDERZOEKSGROEP ECOFYSIOLOGIE EN BIOCHEMIE
GROENENBORGERLAAN 171 U7
2020 ANTWERPEN**

**VLIZ (vzw)
VLAAMS INSTITUUT VOOR DE ZEE
FLANDERS MARINE INSTITUTE
Oostende - Belgium**

Dr. R. Blust
ir. C. Marlé
M. De Bie

Juni 1996

INHOUD

Samenvatting

1.	Probleemstelling	1
2.	Doelstelling	2
3.	Chemische speciatie van dissocieerbare organische contaminanten	4
3.1.	Chemische speciatie en biobeschikbaarheid	4
3.2.	Constructie van een speciatiemodel	5
3.3.	Speciatie van pentachlorofenol	8
3.4.	Speciatie van 1,2,4-trichlorobenzeen	20
3.4.	Speciatie van diquat	20
4.	Partitiecoëfficiënten voor dissocieerbare verbindingen	21
4.1.	Solvent-water partitiecoëfficiënt en biobeschikbaarheid	21
4.2.	Distributieverhouding als functie van pH en saliniteit	22
4.3.	Experimentele bepaling van schijnbare octanol-water partitiecoëfficiënten	24
4.3.	Meerfase model	30
5.	Bepaling van de acute toxiciteit (96h-LC ₅₀ waarden)	35
6.	Accumulatie en kritische lichaamsresidues in functie van de omgevingsomstandigheden	50
6.1.	Opname en toxiciteit	50
6.2.	Opnameproeven met <i>Cyprinodon variegatus</i>	52
6.3.	Analyse van de resultaten aan de hand van een lineair één-compartiment model en bepalen van de kritische lichaamsresidues	53
7.	Besluit	73
8.	Referenties	75
	Bijlage 1	82
	Bijlage 2	83

SAMENVATTING

De invloed van de zuurtegraad en de saliniteit op de accumulatie en de toxiciteit van dissocieerbare organische pollutanten werd onderzocht bij geacclimatiseerde *Cyprinodon variegatus*. Hierbij werd eveneens rekening gehouden met de speciatie onder de verschillende omstandigheden en werd nagegaan in hoeverre de octanol-water partitiecoëfficiënt een goede benadering is voor de accumulatie. Produkten werden gekozen die representatief zijn voor een hele groep dissocieerbare verbindingen en die respectievelijk voorkomen als anion en cation in de bestudeerde pH range (6-8), namelijk pentachlorofenol en diquat. Analoge experimenten werden uitgevoerd met een niet-dissocieerbare verbinding 1,2,4-trichlorobenzeen om na te gaan of de pH en de saliniteit invloed hadden op de permeabiliteit van de uitwisselingsoppervlakken. Ook werden kritische lichaamsresidues bepaald om de invloed van intrinsieke gevoeligheidsverschillen als gevolg van fysiologische wijzingen door abiotische veranderingen beter te begrijpen. Het effect van de saliniteit was veel minder duidelijk dan het effect van de pH. Een stijging van de saliniteit leidde tot een afname van de accumulatie en van de toxiciteit. De vorming van zoutcomplexen had geen significante invloed op de accumulatie en de toxiciteit, maar wel op de octanol-water partitiecoëfficiënt. De vorming van zoutcomplexen met stijgende saliniteit gaat gepaard met een proportionele daling van de activiteit van de ongedissocieerde vorm, die makkelijker opgenomen wordt dan de zoutvorm. Daar het aandeel ongedissocieerd produkt sterk afhankelijk is van de pH, zal de pH een belangrijke rol spelen bij de accumulatie en de toxiciteit. Daar het effect van de saliniteit klein is en er wordt gestreefd naar een minimale vervuiling van het ecosysteem, lijkt het niet aangewezen om andere normen te hanteren voor zoet dan voor zout water.

1. PROBLEEMSTELLING

De toxiciteit van organische polluenten in een aquatisch milieu wordt niet enkel bepaald door de karakteristieken van de polluenten en de structurele en functionele organisatie van de organismen, maar ook door de karakteristieken van het milieu waarin deze zich bevinden. Voorbeelden van dergelijke abiotische karakteristieken zijn de zuurtegraad, temperatuur, saliniteit, hardheid van het water, hoeveelheid opgeloste zuurstof en hoeveelheid opgelost organisch materiaal. Deze omgevingsfactoren kunnen zowel de chemische speciatie als de biobeschikbaarheid, evenals de gevoeligheid van het testorganisme voor de polluent beïnvloeden.

Ondanks het belang van de invloed van de omgevingsfactoren op de toxiciteit, werd tot dusver relatief weinig onderzoek verricht naar de invloed van deze factoren en naar de mechanismen die deze invloed veroorzaken. Ook instanties die verantwoordelijk zijn voor normgeving onderkennen dat het gebrek aan adequate gegevens en inzichten een probleem vormt om op wetenschappelijk onderbouwde basis aan normstelling te kunnen doen. Een criterium voor de toxiciteit van een polluent dat gebaseerd is op slechts één set abiotische variabelen kan overprotectief of onderprotectief zijn voor omgevingen met verschillende fysicochemische eigenschappen (Babich en Stotzky, 1985). In de Water Kwaliteitscriteria erkent ook het U.S. *Environmental Protection Agency* (EPA) de indirecte invloed van de fysicochemische karakteristieken van natuurlijke omgevingen op de toxiciteit van de polluenten. Ook vandaag nog beschikt men over te weinig gegevens en inzichten om voor de verschillende contaminanten rekening te houden met de invloed van omgevingsvariabelen op de toxiciteit.

Om tot een normgeving in functie van verschillende omgevingsfactoren te komen, is het nodig om inzicht te verwerven in de verschillende processen die de accumulatie en toxiciteit van contaminanten kunnen beïnvloeden.

2. DOELSTELLING

Het doel van dit project was de invloed van abiotische factoren zoals de zuurtegraad en saliniteit op de toxiciteit en accumulatie van dissocieerbare organische polluenten in aquatische systemen na te gaan. De experimenten werden uitgevoerd bij $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$ met geacclimatiseerde estuariene vissen, sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) en met twee organische verbindingen. Produkten werden gekozen die representatief zijn voor een hele groep van dissocieerbare verbindingen en die respectievelijk voorkomen als anion en cation in de bestudeerde pH-range (6-8), namelijk pentachlorofenol en diquat. Daarnaast werden ook analoge experimenten uitgevoerd met een niet-dissocieerbare verbinding, namelijk 1,2,4-trichlorobenzeen. Dit liet toe om na te gaan of bepaalde omgevingsfactoren, zoals pH en saliniteit, de samenstelling van de membraanlipiden of andere fysiologische factoren kunnen veranderen en op die manier de permeabiliteit van de uitwisselingsoppervlakken beïnvloeden. Bij het project wordt aandacht besteed aan volgende aspecten:

1. De studie van de chemische speciatie van de gekozen dissocieerbare organische polluenten. Dit resulteerde in de constructie van een mathematisch model voor de speciatie van voorlopig enkel pentachlorofenol in functie van omgevingsfactoren zoals zuurtegraad en saliniteit;
2. De bepaling van partiticoëfficiënten van deze organische contaminanten tussen water en een organische fase (1-octanol) in functie van de omgevingsomstandigheden. Een meergefase model kon dan geconstrueerd worden dat de invloed van speciatie op de verdeling van contaminanten tussen een organische en een waterige fase beschrijft;
3. De bepaling van de acute toxiciteit (96h-LC₅₀ waarden) voor de verschillende componenten in functie van de pH en de saliniteit bij $25.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$;
4. De studie van de accumulatie van de gekozen dissocieerbare contaminanten in functie van de omgevingsomstandigheden. Hierbij werd aandacht besteed aan de invloed van het milieu op de chemische speciatie. De resultaten werden geïnterpreteerd aan de hand van een lineair één-compartimentmodel. Ook worden kritische lichaamsresidues bepaald om de invloed van de intrinsieke gevoeligheidsverschillen als gevolg van fysiologische wijzigingen door

abiotische veranderingen op de accumulatie beter te begrijpen;

Inzicht in elk van deze aspecten liet toe de invloed van de omgevingsvariabelen op de toxiciteit van dissocieerbare organische polluenten beter te begrijpen en adviezen te geven met betrekking tot normgeving.

3. CHEMISCHE SPECIATIE VAN DISSOCIEERBARE ORGANISCHE CONTAMINANTEN

3.1. Chemische speciatie en biobeschikbaarheid

Chemische speciatie is de verdeling van de totale hoeveelheid van een bepaalde verbinding over alle mogelijke chemische en fysische vormen (species). Een dissocieerbare verbinding kan voorkomen onder de niet-gedissocieerde of onder de gedissocieerde vorm, al dan niet geassocieerd met een tegenion. Daarnaast kunnen organische polluenten ook interageren met bijvoorbeeld opgelost organisch materiaal.

De verschillende chemische species die in het aquatisch milieu voorkomen worden niet allemaal even gemakkelijk opgenomen. De chemische speciatie zal hierdoor een belangrijke factor zijn met betrekking tot de biobeschikbaarheid. Een beter begrip van de opname en de effecten van organische polluenten in aquatische organismen wordt dus pas mogelijk wanneer de speciatie als functie van de omgevingsfactoren in voldoende detail gekend is.

Speciatie wordt beïnvloed door factoren zoals de zuurtegraad, temperatuur, saliniteit en opgelost organisch materiaal (OOM).

De *invloed van de pH* op de speciatie van dissocieerbare verbindingen wordt vrij goed begrepen. Onderscheid dient gemaakt te worden tussen organische polluenten met een zuur en met een basisch karakter. Hierbij speelt de pK_a van de verbinding een cruciale rol. De pK_a van een component is de pH waarbij 50% van die component gedissocieerd is. Bij een pH hoger dan de pK_a , komt een zure verbinding ($AH \rightleftharpoons A^- + H^+$) voornamelijk voor onder de gedissocieerde vorm, waardoor associatiereacties met de in het water aanwezige ionen mogelijk zijn. Bij een basische component ($BH^+ \rightleftharpoons B + H^+$) komt de geprotoneerde vorm overwegend voor bij een pH lager dan de pK_a .

De *invloed van de saliniteit* is relatief complex. Enerzijds kan men een invloed van de saliniteit verwachten door de aanwezigheid van tegenionen waardoor associatiereacties kunnen optreden en anderzijds zal de saliniteit een verandering in de ionische sterkte

veroorzaken waardoor de activiteit van de verschillende componenten zal wijzigen. Hier zal later op teruggekomen worden. Men kan daarom verwachten dat ook de saliniteit de opname en de toxiciteit zal beïnvloeden.

De *temperatuur* zal een invloed hebben op de oplosbaarheid en de evenwichtsreacties, waardoor organische componenten een verhoogde of verlaagde biobeschikbaarheid kunnen hebben bij hogere temperatuur.

Sorptie aan oppervlakken zoals aan *gesuspendeerd materiaal* en sedimenten beïnvloedt de concentratie van een organische chemicalie in de wateroplosbare fase van een aquatisch ecosysteem en kan op die manier de opname van het chemicalie door het organisme beïnvloeden. Voor dissocierbare verbindingen bestaat bovendien de mogelijkheid van interactie tussen de gedissocieerde vorm en geladen groepen aan het oppervlak van de sedimenten (Chiou et al., 1986). Verscheidene auteurs meldden een verlaagde biobeschikbaarheid van bv. poly-aromatische koolwaterstoffen (Leversee et al., 1983; McCarthy et al., 1985; Kukkonen et al., 1989), synthetische pyrethroiden (Day, 1991), gechlloreerde pesticiden (Steinberg et al., 1993) of cationische polymeren (Goodrich et al., 1991) met toenemend gehalte aan *opgelost organisch materiaal (OOM)*. Ten gevolge van sorptie aan het OOM nam de biobeschikbaarheid en dus ook de toxiciteit af. Ook zal de ionisatie een invloed hebben op de sediment-water partiticoëfficiënt, net zoals dit het geval is voor de octanol-water partiticoëfficiënt die later uitvoerig zal besproken worden.

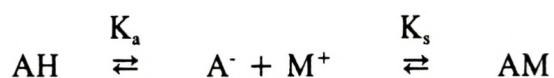
Daar het onderhavig onderzoek zich toespitst op de abiotische factoren saliniteit en zuurtegraad, zal de invloed van de temperatuur en de aanwezigheid van opgelost organisch materiaal op de chemische speciatie niet verder worden bestudeerd. Bij de constructie van het speciatiemodel wordt dan ook enkel de invloed van de saliniteit en de pH in rekening gebracht.

3.2. Constructie van een speciatiemodel

De bedoeling van dit deel van het onderzoek is de constructie van een mathematisch model voor de speciatie van de contaminanten in aquatische systemen in functie van omge-

vingsfactoren zoals de zuurtegraad en de saliniteit.

Voor organische polluenten met een zuur karakter kan de invloed van de pH en saliniteit (uitgewerkt voor een éénwaardig kation) als volgt worden voorgesteld:



met $\text{M}^+ = \text{éénwaardig kation}$

Hiervoor gelden volgende evenwichtsvergelijkingen:

$$\frac{1}{K_a} = \frac{[\text{AH}]}{[\text{H}^+][\text{A}^-]} \cdot \frac{\gamma_{\text{AH}}}{\gamma_{\text{H}^+} \gamma_{\text{A}^-}}$$

$$K_s = \frac{[\text{AM}]}{[\text{M}^+][\text{A}^-]} \cdot \frac{\gamma_{\text{AM}}}{\gamma_{\text{M}^+} \gamma_{\text{A}^-}}$$

waarin K_a de thermodynamische zuurconstante, K_s de thermodynamische stabiliteitsconstante voor de zoutvorm, γ de activiteitscoëfficiënten en de vierkante haken [] de concentraties voorstellen van de beschouwde species.

Deze worden aangevuld met de massabalans:

$$[\text{A}]_{\text{totaal}} = [\text{A}^-] + [\text{AH}] + [\text{AM}]$$

De K_a - en K_s -waarden werden afgeleid uit literatuurgegevens. De activiteitscoëfficiënten γ zijn doorgaans niet gekend. Vandaar dat deze uitdrukkingen herschreven worden als

$$\frac{1}{Q_a} = \frac{[AH]}{[H^+][A^-]}$$

$$Q_s = \frac{[AM]}{[M^+][A^-]}$$

waarbij Q_a en Q_s de conditionele stabiliteitsconstanten zijn waarvoor geldt:

$$Q = f(I)$$

Voor een ionische sterkte (I) gelijk aan nul, wordt Q gelijk aan K . De stabiliteitsconstanten die de evenwichtsrelaties beschrijven, zijn afhankelijk van de ionische sterkte en temperatuur van het milieu. Het effect van de ionische sterkte is het meest uitgesproken en kan worden beschreven door een bijzondere vorm van de Debye-Hückel vergelijking (Turner et al., 1981):

$$\log Q = \log K + S \cdot \Delta z^2 \cdot \sqrt{I} / (1 + B \cdot \sqrt{I}) + C \cdot I + D \cdot I^2$$

met Q = conditionele stabiliteitsconstante bij ionische sterkte $I > 0$;
 K = thermodynamische stabiliteitsconstante bij ionische sterkte $I = 0$;
 S = Debye-Hückel slope = $0,511 \text{ mol}^{-1/2} \cdot l^{1/2}$ bij 25°C en 1 atm. ;
 $\Delta z^2 = \sum z^2 \text{ (products)} - \sum z^2 \text{ (reactants)}$;
 met z_A : lading van de ionen
 I = ionische sterkte ($\text{mol} \cdot l^{-1}$) = $(\sum [A] \cdot z_A^2) / 2$
 met $[A]$: conc van de ionen ($\text{mol} \cdot l^{-1}$);
 z_A : lading van de ionen
 B, C en D = te schatten Debye-Hückel parameters.

Regressie van de kritische stabiliteitsconstanten gemeten bij verschillende ionische sterkte aan de Debye-Hückel vergelijking, geeft een schatting voor de parameters K , B en C waarmee de conditionele stabiliteitsconstante van het evenwicht kan berekend worden bij willekeurige ionische sterkte tussen 0 en 3 M , de range waarin in de meeste gevallen de stabiliteitsconstanten worden gemeten. De parameter D kan enkel significant gefit worden aan de datapunten als de fout op de stabiliteitsconstanten heel klein is (± 0.01), wat slechts in

een zeer beperkt aantal gevallen opgaat. De invloed van de temperatuur op de ligging van het evenwicht is afhankelijk van de enthalpie van de reactie en kan worden berekend met behulp van de vergelijking van Van't Hoff.

Aan de hand van een dergelijk model wordt dan de chemische speciatie van de contaminanten in functie van de omgevingsomstandigheden berekend. Dit model kan uitgebreid worden met een factor die rekening houdt met de invloed van gesuspendeerd en opgelost organisch materiaal door het invoeren van een additionele partitiecoëfficiënt K_p .

3.3. Speciatie van pentachlorofenol

Pentachlorofenol is een zwak zuur met lage pK_a , waardoor het in natuurlijk milieu voornamelijk voorkomt als éénwaardig anion. Pentachlorofenol vormt eveneens zwakke bindingen met alkali- en aardalkalimetalen. Dit betekent dat naarmate de saliniteit van het water toeneemt een deel van het pentachlorofenol associeert met natrium, kalium, calcium en magnesium. Wanneer men over de vormingsconstanten (stabiliteitsconstanten) beschikt die de reactie tussen de componenten in het milieu beschrijven, dan kunnen de concentraties van de verschillende vormen waarin pentachlorofenol voorkomt in het milieu worden berekend. Voor de berekening van de speciatie in functie van pH en saliniteit voor water met gekende samenstelling werd gebruik gemaakt van het programma SOLUTION (Blust et al., unpubl.). Het basisalgoritme in het model is gebaseerd op de mathematische routines gebruikt in het model COMPLEX (Ginzburg, 1976).

De fitting van de kritische stabiliteitsconstanten aan een vergelijking van de vorm van een extended Debye-Hückel vergelijking, geeft volgende waarden (zie Tabel 1) voor de te schatten parameters K , B en C voor de verschillende species. De stabiliteitsconstanten voor de componenten, behalve deze voor pentachlorofenol, zijn gebaseerd op data van Dickson en Whitfield (1981), deze voor pentachlorofenol op Demianov et al. (1995). Enthalpie-waarden die het effect van de temperatuur beschrijven op de evenwichtsconstanten worden gegeven door Byrne et al. (1988) en door Smith & Martell (1989). De speciatie werd voor dit verslag enkel berekend bij 25°C, zodat de enthalpie-waarden niet nodig waren voor de berekening van de speciatie.

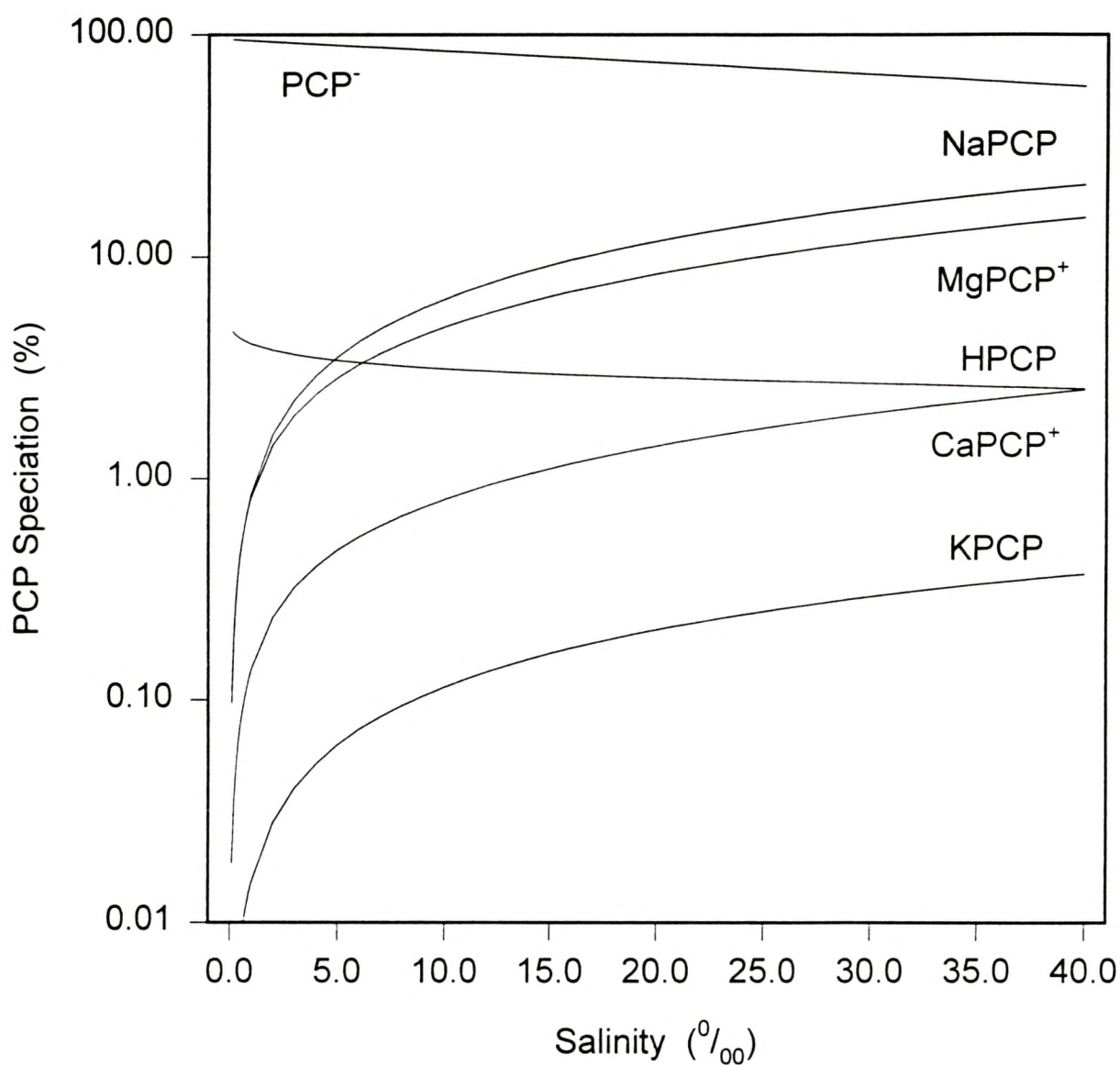
Tabel 1. Waarden voor de te schatten parameters in de Debye-Hückel vergelijking voor de verschillende species

	log K	B	C
$\text{H}^+ + \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{HSO}_4^-$	1.98	3.009	0.0159
$\text{Na}^+ + \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{NaSO}_4^-$	0.82	2.993	-0.201
$\text{Na}^+ + \text{H}^+ + \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{NaHSO}_4$	1.28	2.384	0.137
$\text{K}^+ + \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{KSO}_4^-$	0.85	2.876	-0.260
$\text{Ca}^{2+} + \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{CaSO}_4$	2.31	2.244	0.382
$\text{Ca}^{2+} + \text{H}^+ + \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{CaHSO}_4^+$	2.28	2.298	0.0981
$\text{Mg}^{2+} + \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{MgSO}_4$	2.25	2.280	0.442
$\text{Mg}^{2+} + \text{H}^+ + \text{SO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{MgHSO}_4^+$	2.38	2.339	0.157
$\text{H}^+ + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^-$	10.33	2.246	0.0990
$2 \text{H}^+ + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{CO}_3$	16.68	1.763	0.332
$\text{Na}^+ + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{NaCO}_3^-$	0.70	1.892	0.0253
$\text{Na}^+ + \text{H}^+ + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{NaHCO}_3$	10.08	1.740	0.384
$\text{K}^+ + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{KCO}_3^-$	0.70	1.811	-0.0280
$\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{CaCO}_3$	3.15	1.769	0.632
$\text{Ca}^{2+} + \text{H}^+ + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{CaHCO}_3^+$	11.43	1.827	0.337
$\text{Mg}^{2+} + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{MgCO}_3$	2.88	1.800	0.690
$\text{Mg}^{2+} + \text{H}^+ + \text{CO}_3^{2-} \rightleftharpoons \text{MgHCO}_3^+$	11.34	1.859	0.396
$\text{Na}^+ + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{NaOH}$	-0.20	1.252	0.386
$\text{Ca}^+ + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{CaOH}^+$	1.15	1.647	0.330
$\text{Mg}^+ + \text{OH}^- \rightleftharpoons \text{MgOH}^+$	2.21	1.704	0.338

$\text{H}^+ + \text{PO}_4^{3-} \rightleftharpoons \text{HPO}_4^{2-}$	12.33	2.485	-0.180
$2\text{H}^+ + \text{PO}_4^{3-} \rightleftharpoons \text{H}_2\text{PO}_4^-$	19.48	3.236	0.0622
$\text{H}^+ + 2\text{H}^+ + \text{PO}_4^{3-} \rightleftharpoons \text{H}_3\text{PO}_4$	21.67	2.609	0.141
$\text{Na}^+ + \text{H}^+ + \text{PO}_4^{3-} \rightleftharpoons \text{NaHPO}_4^-$	13.36	2.350	-0.0304
$\text{K}^+ + \text{H}^+ + \text{PO}_4^{3-} \rightleftharpoons \text{KHPO}_4^-$	13.25	2.354	-0.0322
$\text{Ca}^{2+} + \text{H}^+ + \text{PO}_4^{3-} \rightleftharpoons \text{CaHPO}_4$	15.04	1.500	1.014
$\text{Ca}^{2+} + 2\text{H}^+ + \text{PO}_4^{3-} \rightleftharpoons \text{CaH}_2\text{PO}_4^+$	20.88	1.500	1.117
$\text{Mg}^{2+} + \text{H}^+ + \text{PO}_4^{3-} \rightleftharpoons \text{MgHPO}_4$	15.29	1.500	0.537
$\text{Mg}^{2+} + 2\text{H}^+ + \text{PO}_4^{3-} \rightleftharpoons \text{MgH}_2\text{PO}_4^+$	21.11	1.500	0.276
$\text{PCP}^- + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{HPCP}$	4.74 (= pK_a)	2.206	0.286
$\text{PCP}^- + \text{Na}^+ \rightleftharpoons \text{NaPCP}$	-0.05	2.206	0.286
$\text{PCP}^- + \text{K}^+ \rightleftharpoons \text{KPCP}$	-0.10	2.206	0.286
$\text{PCP}^- + \text{Ca}^{2+} \rightleftharpoons \text{CaPCP}^+$	0.95	2.206	0.473
$\text{PCP}^- + \text{Mg}^{2+} \rightleftharpoons \text{MgPCP}^+$	1.00	2.206	0.473

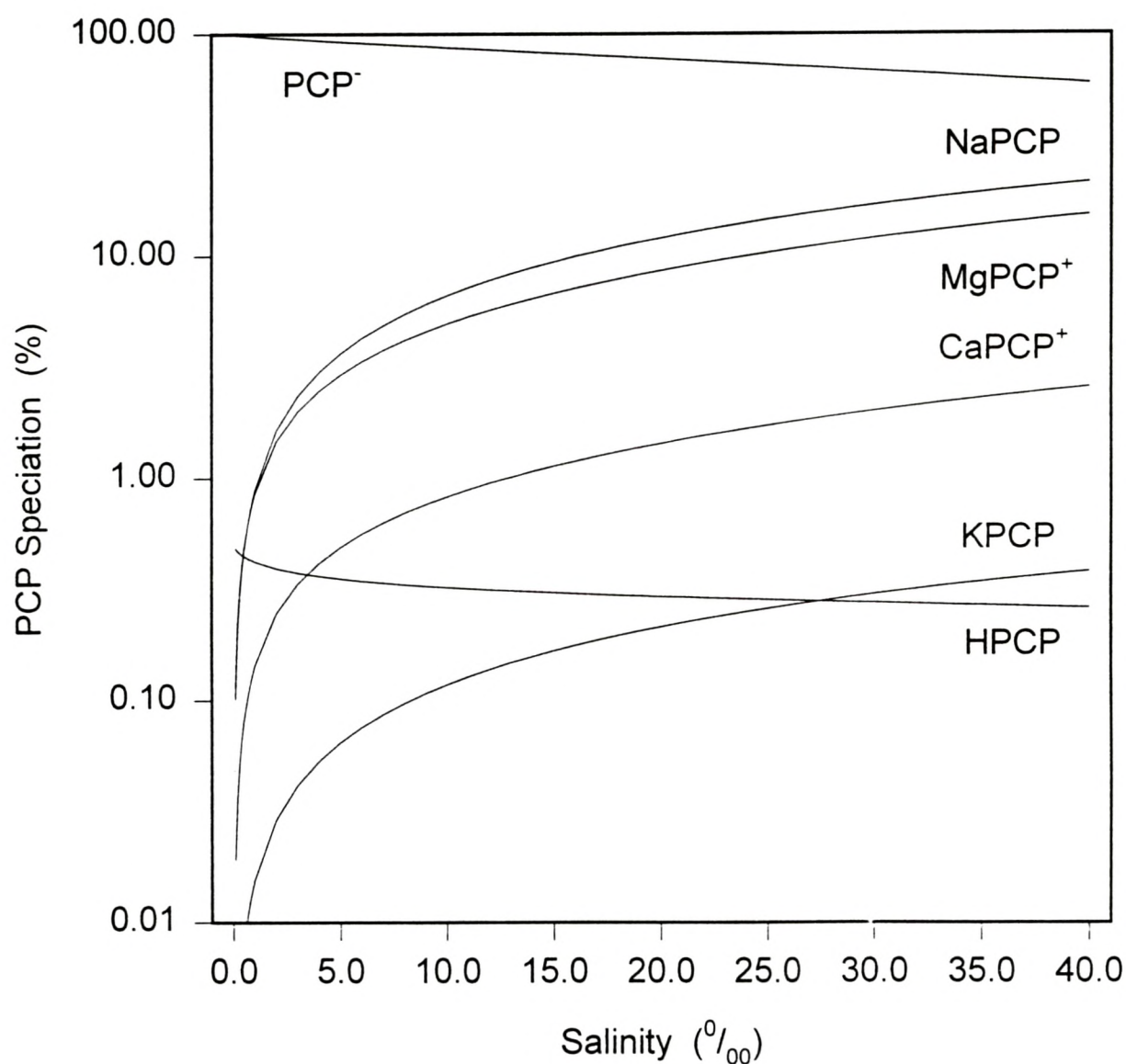
De waarden uit Tabel 1 worden als input ingegeven in het model SOLUTION, waarna de speciatie wordt berekend voor pH 6, 7 en 8 en saliniteit 1, 10 en 30 g.l⁻¹ bij 25°C. De resultaten van de speciatie berekeningen zijn gegeven in Figuur 1 tot 6. Hieruit blijkt dat een daling van de zuurtegraad (stijging van de pH) resulteert in een daling van de concentratie ongedissocieerd pentachlorofenol. Bij pH 6 vertegenwoordigt deze species (HPCP) bijvoorbeeld 5% van het totale pentachlorofenol, terwijl dit bij pH 8 nog slechts 0.05% bedraagt. Dit gaat gepaard met een evenredige stijging in de concentratie van alle andere pentachlorofenol species. Stijging van de saliniteit gaat gepaard met de vorming van natrium, kalium-, calcium- en magnesiumpentachlorofenolaatcomplexen. Bij een saliniteit van 1 g.l⁻¹ vertegenwoordigen deze species samen minder dan 0.2% van de totale concentratie, terwijl ze bij een saliniteit van 30 g.l⁻¹ meer dan 20% van de totale pentachlorofenol concentratie uitmaken.

Speciation of PCP as function of salinity (pH=6.0)



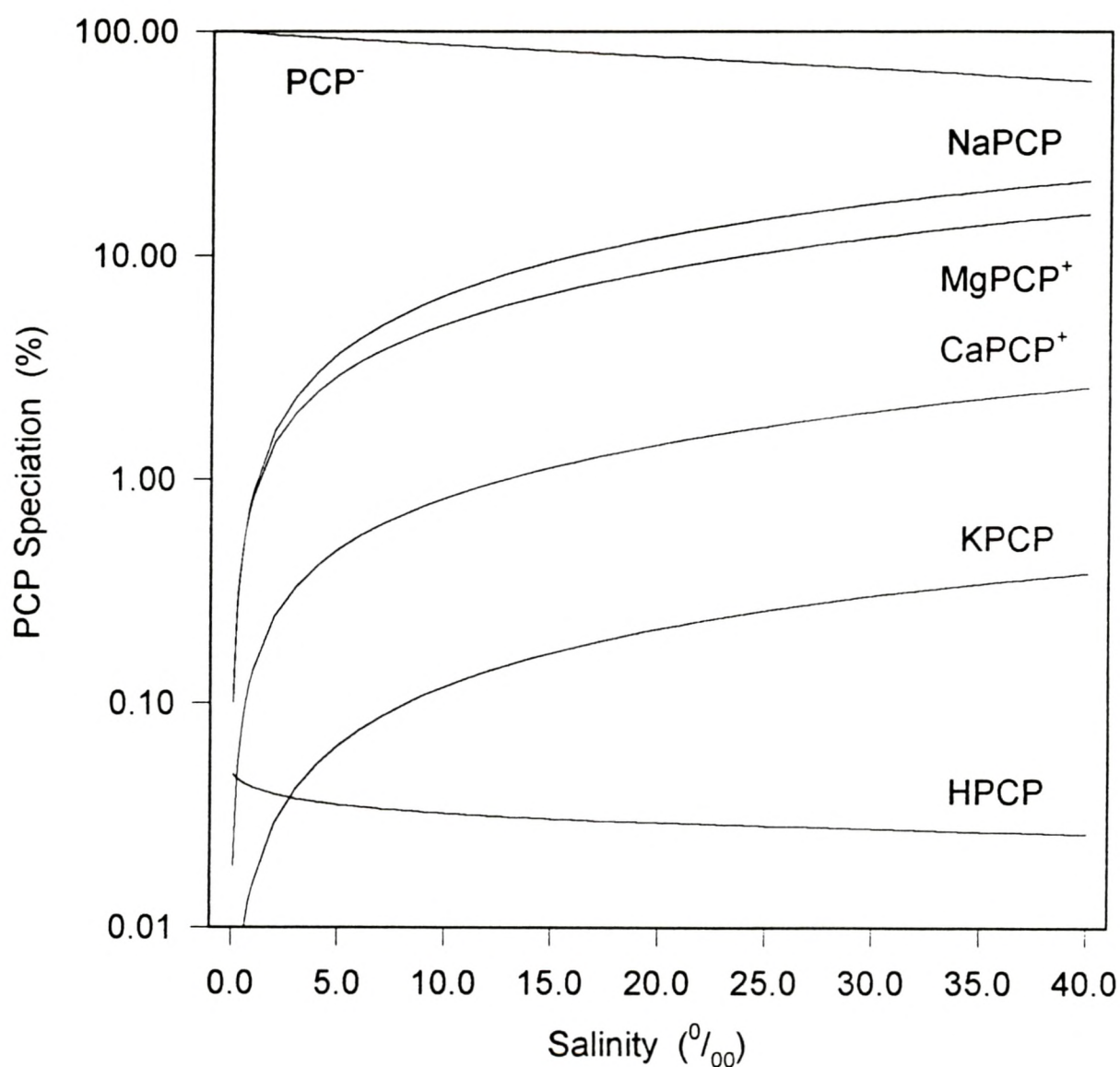
Figuur 1. Speciatie van pentachlorofenol in functie van de saliniteit bij 25°C (pH = 6.0)

Speciation of PCP as function of salinity (pH=7.0)



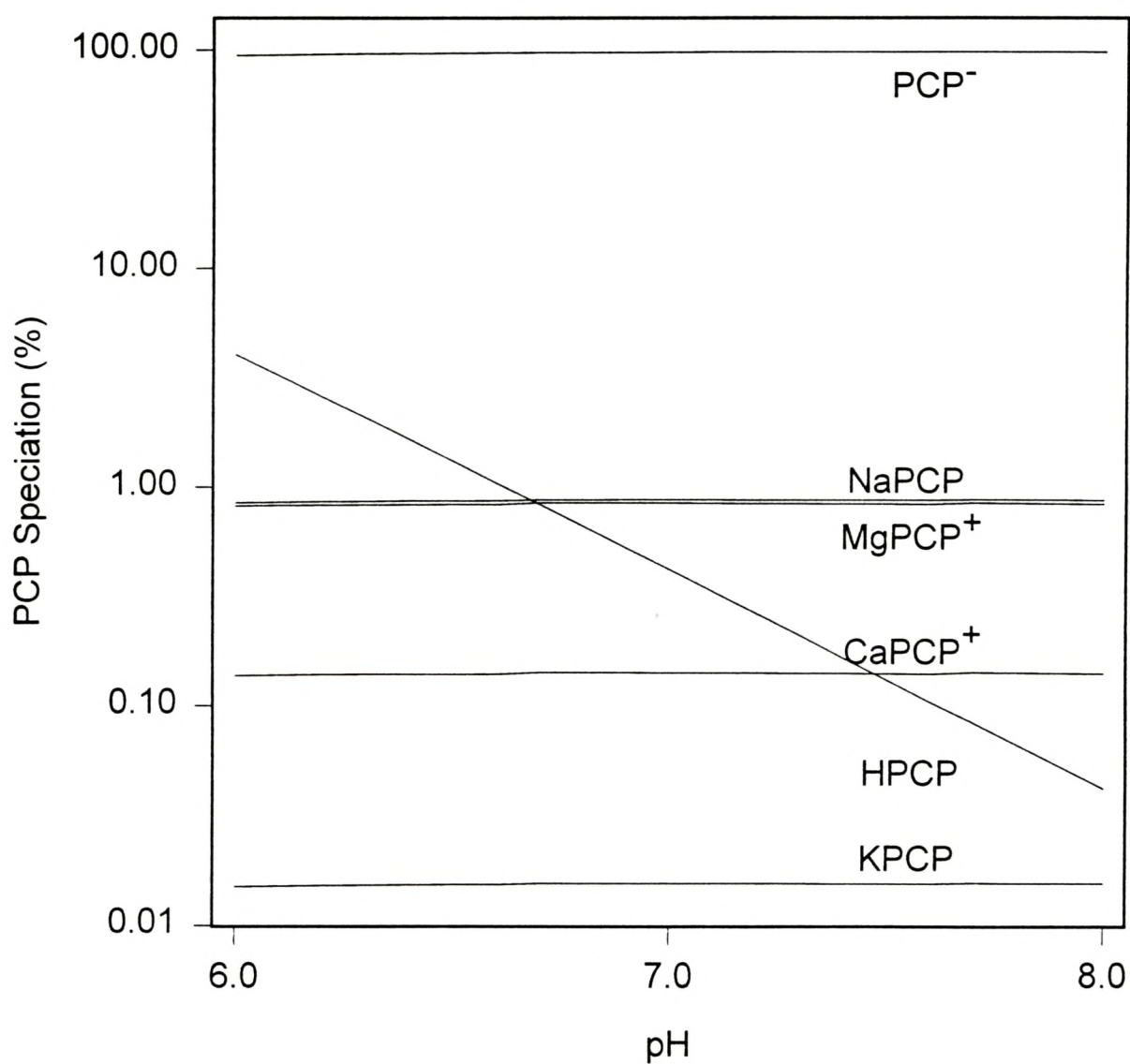
Figuur 2. Speciatie van pentachlorofenol in functie van de saliniteit bij 25°C (pH = 7.0)

Speciation of PCP as function of salinity (pH=8.0)



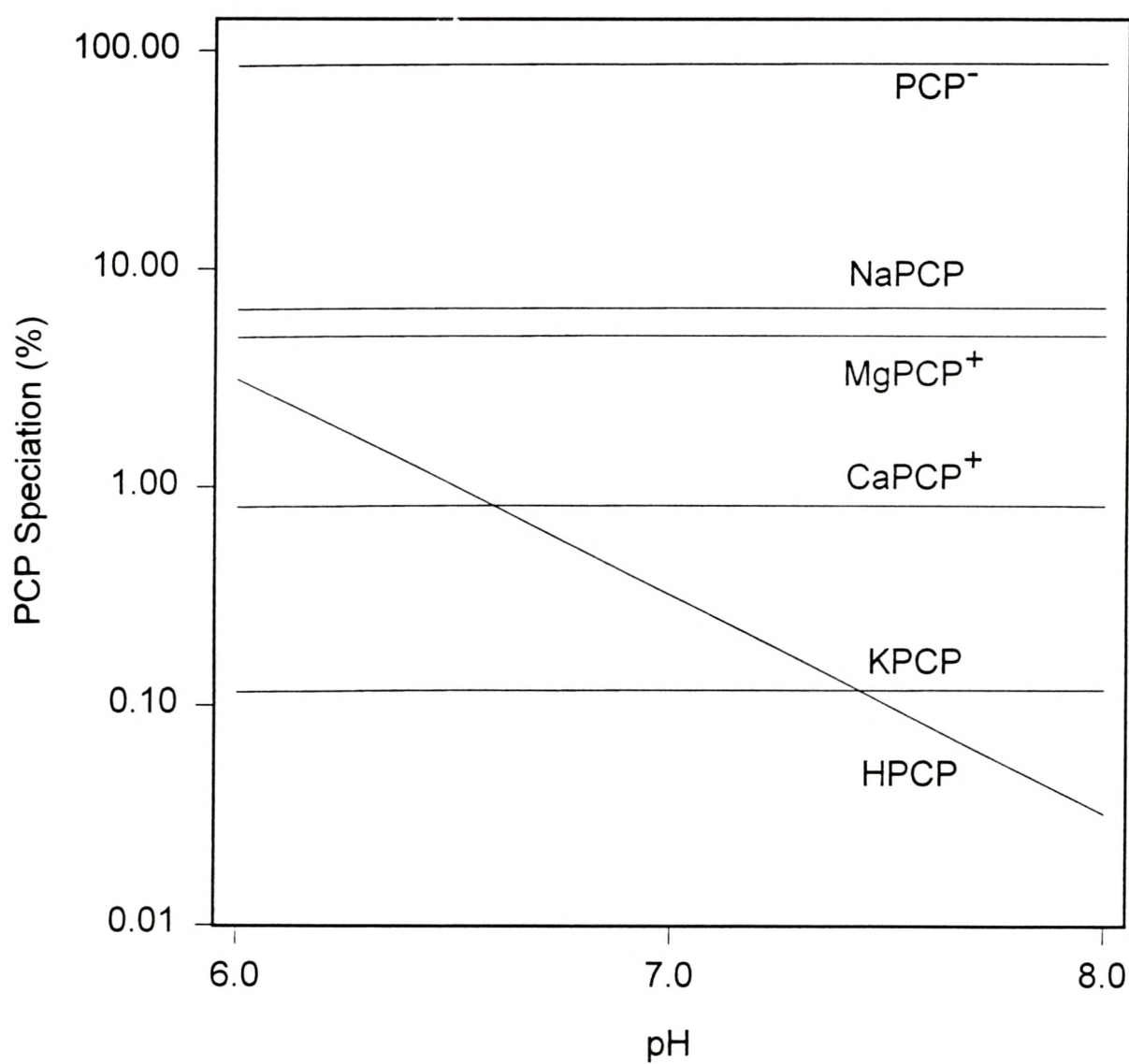
Figuur 3. Speciatie van pentachlorofenol in functie van de saliniteit bij 25°C (pH = 8.0)

Speciation of PCP as function of pH (sal=1‰)



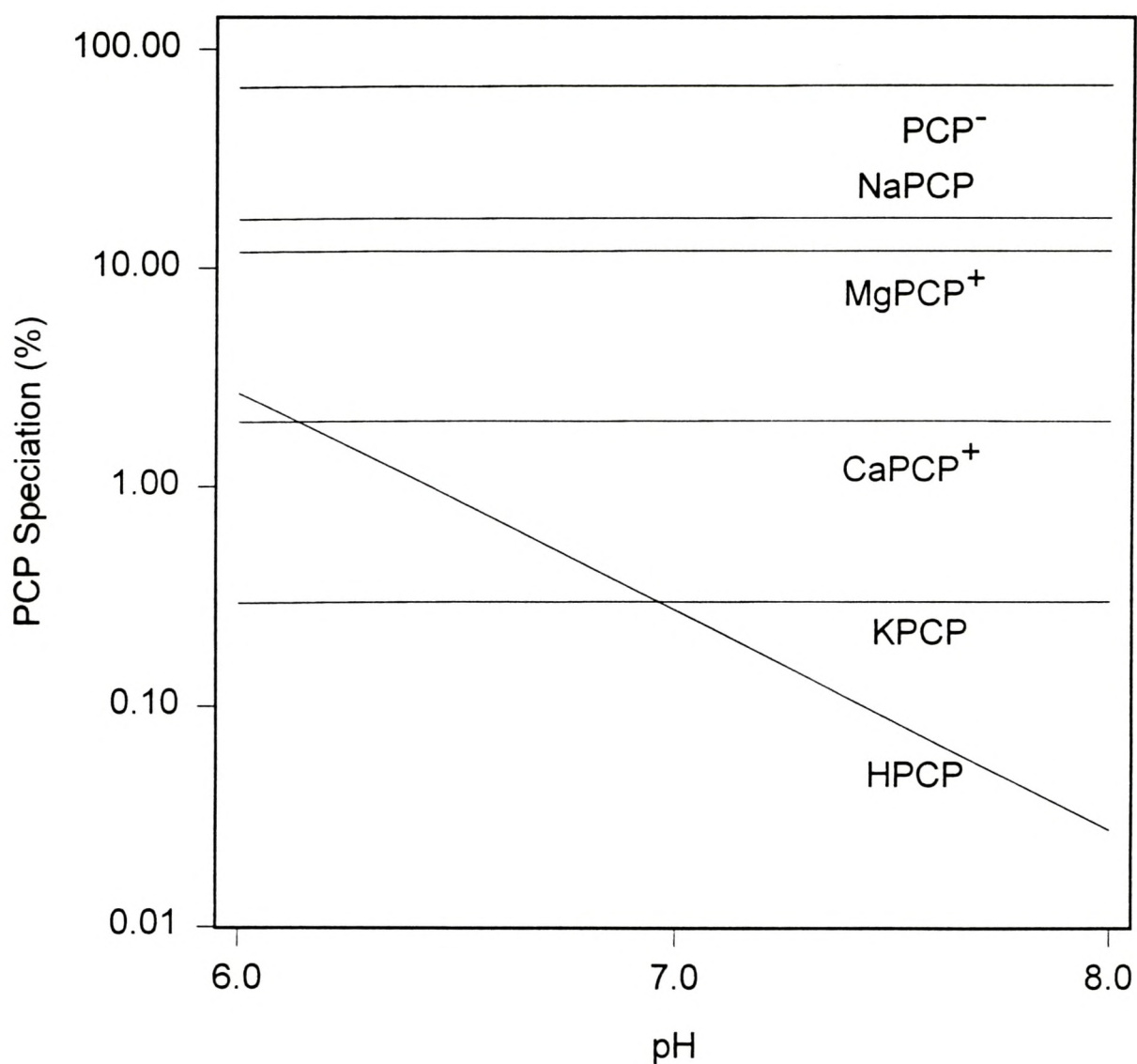
Figuur 4. Speciatie van pentachlorofenol in functie van de pH bij 25°C (sal = 1 g.l⁻¹)

Speciation of PCP as function of pH (sal=10⁰/₀₀)



Figuur 5. Speciatie van pentachlorofenol in functie van de pH bij 25°C (sal = 10 g.l⁻¹)

Speciation of PCP as function of pH (sal=30⁰/₀₀)



Figuur 6. Speciatie van pentachlorofenol in functie van de pH bij 25°C (sal = 30 g.l⁻¹)

Bij het bepalen van de effecten van pollutanten in het milieu is het niet zozeer de concentratie dan wel de activiteit van de species in het water van belang. Bij de verdere analyse van de resultaten betreffende de toxiciteit en accumulatie van pentachlorofenol bij de vissen worden de effecten zowel gerelateerd naar de activiteiten van de species in het water als naar de concentraties. De activiteit van de onderscheiden chemische species is afhankelijk van de temperatuur en van de ionische sterkte van het milieu. De effecten van de temperatuur zijn vrij gering binnen normale temperatuurslimieten (0-40°C) maar de effecten van ionische sterkte (0.0-0.7 M) zijn dit niet. De invloed van de ionische sterkte op de activiteit van een species is sterk afhankelijk van de lading van de species en wordt uitgedrukt door de activiteitscoëfficiënt. De activiteitscoëfficiënt is gelijk aan 1 in een oneindig verdunde oplossing en verschilt van 1 wanneer de ionische sterkte toeneemt. Voor het berekenen van de invloed van de ionische sterkte op de activiteitscoëfficiënten zijn verschillende modellen beschikbaar. Het model dat hier werd gebruikt voor het berekenen van de activiteitscoëfficiënten van geladen species is dit van Sposito en Traina (1987) dat werd ontwikkeld voor het berekenen van activiteitscoëfficiënten in natrium chloride oplossingen en uitgaat van volgende uitdrukking voor de neutrale zoutcomplexen (NaPCP en KPCP):

$$\log \gamma_i = -11.7 * \left(\frac{I}{1+60.8128*I} - 0.039*I^2 \right) - 0.044*I^3$$

met γ_i = activiteitscoëfficiënt van het beschouwde species i;

I = ionische sterkte (M);

en voor de éénwaardig geladen zoutcomplexen (CaPCP⁺, MgPCP⁺):

$$\log \gamma_i = -0.511 * \left(\frac{\sqrt{I}}{1+\sqrt{I}} - 0.3*I \right)$$

met γ_i = activiteitscoëfficiënt van het beschouwde species i;

I = ionische sterkte (M).

Voor de ongedissocieerde vorm (HPCP) werd de vergelijking van Setchenow-Harned-Owen (Harned & Owen, 1958) gebruikt:

$$\log \gamma_i = k_s \cdot I$$

met γ_i = activiteitscoëfficiënt van het beschouwde species i;

k_s = een empirisch bepaalde coëfficiënt 0.1

I = ionische sterkte (M)

De resultaten van deze berekeningen zijn weergegeven in Figuur 7. De activiteit van de onderscheiden species wordt bekomen door de concentratie van de species te vermenigvuldigen met de betreffende activiteitscoëfficiënt, dus:

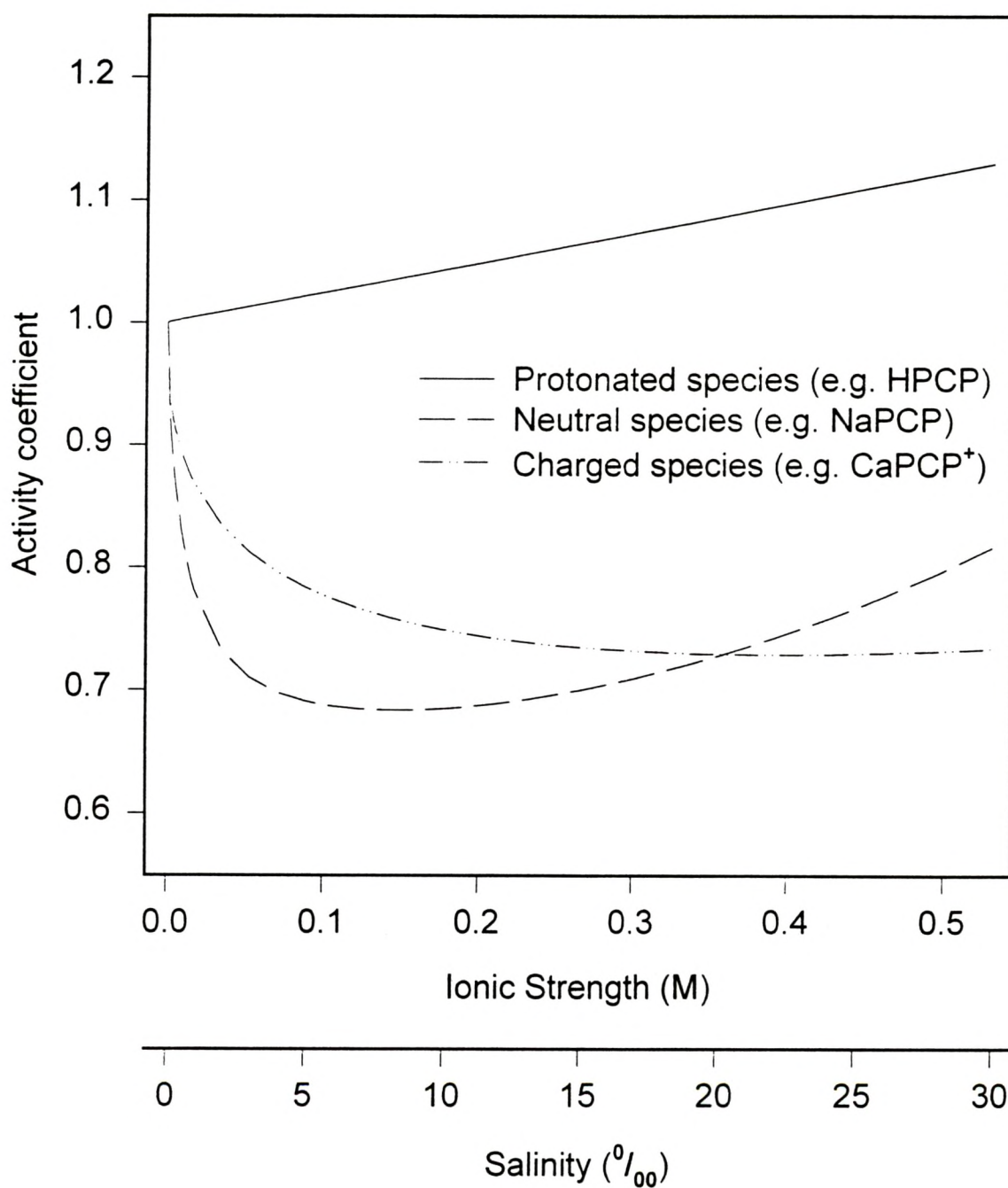
$$(C_i) = \gamma_i \cdot [C_i]$$

met (C_i) = activiteit van species i in oplossing (M);

γ_i = activiteitscoëfficiënt van species i in oplossing;

$[C_i]$ = concentratie van species i in oplossing (M).

Activity coefficients as function of ionic strength



Figuur 7. Activiteitscoëfficiënten als functie van de ionische sterkte

3.4. Speciatie van 1,2,4-trichlorobenzeen

Daar 1,2,4-trichlorobenzeen een niet-dissocieerbare verbinding is, is speciatie hier niet van toepassing. Voor neutrale niet-polaire componenten wordt echter wel een daling van de oplosbaarheid waargenomen met een stijging van de ionische sterkte. Dit effect is bekend als het "salting-out" effect. Setschenow (1889) vond een empirisch verband die de oplosbaarheid van organische componenten in zoute oplossingen relateert met die van zuiver water:

$$\log\left[\frac{C_w}{C_{w,salt}}\right] = K_s \cdot [salt]_t$$

met C_w = water oplosbaarheid van de component in zuiver water (mol.l⁻¹);
 $C_{w,salt}$ = water oplosbaarheid van de component in zoute oplossing (mol.l⁻¹);
 K_s = de Setschenow of uitzoutingsconstante;
 $[salt]_t$ = totale zout concentratie (mol.l⁻¹).

De Setschenow constante geeft de mogelijkheid weer van een bepaald zout of van een combinatie van zouten om een gegeven component "uit te zouten".

3.5. Speciatie van diquat

Uit literatuuronderzoek bleek dat er tot op heden geen experimentele data beschikbaar waren over de interactie tussen diquat en de belangrijkste anionen aanwezig in zee en zoet water. Vandaar dat moet teruggevallen worden op stabiliteitsconstanten tussen soortgelijke groepen om deze constanten te schatten. Maar ook deze informatie is slechts in zeer beperkte mate in de literatuur beschikbaar. Een andere mogelijkheid bestaat erin deze stabiliteitsconstanten experimenteel te bepalen. Daar dit binnen het gegeven tijds kader niet mogelijk was, kon de speciatie van diquat voorlopig niet berekend worden.

4. PARTITIECOEFFICIENTEN VOOR DISSOCIEERBARE VERBINDINGEN

4.1. Solvent-water partitievoëfficiënt en biobeschikbaarheid

De neiging van een verbinding om op te lossen in een organisch solvent in vergelijking met de neiging van dezelfde verbinding om op te lossen in water wordt gegeven door een solvent-water partitievoëfficiënt. Deze wordt gedefinieerd als de ratio van de concentratie in het gekozen solvent tot de concentratie in water. Meestal wordt 1-octanol als solvent gekozen en bepaalt men dus de octanol-water partitievoëfficiënt K_{ow} . Mackay (1982) toonde aan dat K_{ow} een goede eerste benadering geeft voor de biologische bioconcentratiefactor BCF. De bioconcentratiefactor wordt gedefinieerd als:

$$BCF = \frac{C_o}{C_w}$$

met C_o : concentratie van de organische component in het organisme bij evenwicht;
en C_w : concentratie van de organische component in het water bij evenwicht.

De *octanol-water partitievoëfficiënt* voor ioniseerbare verbindingen wordt doorgaans gedefinieerd voor een specifieke (meestal de neutrale, dus niet-gedissocieerde) vorm:

$$K_{ow} = \frac{[AH]}{[AH]}$$

met de overlijnde vorm de concentratie van de vorm in de organische fase (1-octanol);
en de niet-overlijnde vorm de concentratie van de vorm in de waterige fase.

Wanneer de biobeschikbaarheid van dissocieerbare componenten wordt bepaald aan de hand van de regressie met deze K_{ow} -waarde, wordt echter geen rekening gehouden met de verhouding niet-gedissocieerde/gedissocieerde vorm van een bepaalde component. Log K_{ow} zal voor deze componenten een minder goede maat zijn voor BCF. Verschillende studies toonden inderdaad aan dat polaire en voornamelijk ioniseerbare organische componenten niet hetzelfde patroon volgen als niet-polaire componenten (Weidenhaupt, 1994; Tas, 1993).

Een interessante parameter met betrekking tot dissocieerbare verbindingen is de *partitieverhouding D* (Westall et al., 1985), ook soms de *schijnbare octanol-water partitiecoëfficiënt* genoemd (Kaiser en Valdmanis, 1982), welke gedefinieerd wordt voor de totale analytische concentratie, zonder de specifieke aanwezige vormen te specificeren. Voor zure organische componenten zoals fenolen wordt deze gegeven door:

$$D_{ow} = \frac{[AH] + [A^-] + [AM]}{[AH] + [A^-] + [AM]}$$

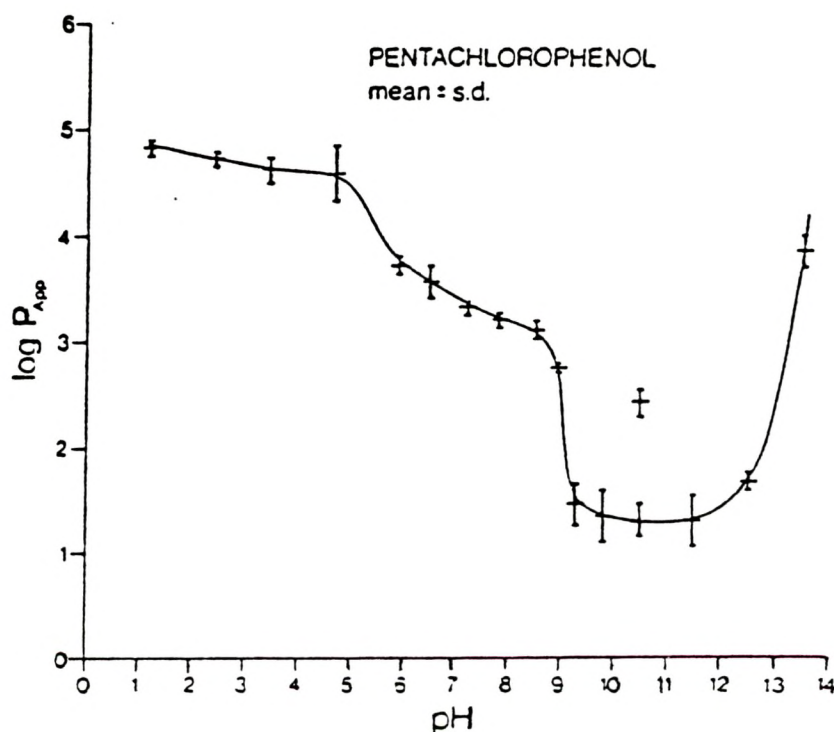
Een derde mogelijkheid bestaat erin *partitiecoëfficiënten* te definiëren voor elk van de aanwezige vormen. Wanneer experimenteel de partitieverhouding D wordt bepaald bij verschillende waarden van pH en saliniteit (dus bij verschillende speciatie in waterige fase) dan kunnen hieruit de afzonderlijke partitiecoëfficiënten voor elk van de species worden bepaald. Dit kan gebeuren aan de hand van het twee fasen model dat in paragraaf 4.4. wordt besproken.

In deze studie zal de partitieverhouding voor elk van de bestudeerde polluenten worden bepaald als functie van de pH en de saliniteit. Vervolgens zal aan de hand van deze experimentele gegevens een meerfase model worden geconstrueerd. Vooreerst echter worden enkele van de literatuurgegevens geresumeerd.

4.2. Distributieverhouding als functie van pH en saliniteit

Verscheidende studies zijn gekend waarbij de partitieverhouding als functie van de pH en de saliniteit werden bestudeerd. De complexe verdelingsevenwichten werden bijvoorbeeld bestudeerd voor chloorfenolen door Kaiser en Valdmanis (1982), Westall et al. (1985) en door Jafvert et al. (1990), voor methylanilines door Johnson en Westall (1990), voor methylkwik verbindingen door Faust (1992) en door Major et al. (1991), voor methyltin verbindingen door Tas (1993) en door Weidenhaupt (1994) en voor chloorsulfuron door Ribo (1988). Zij constateerden allemaal een niet-lineair verloop van de partitiecoëfficiënt als functie van de pH.

Zo vonden Kaiser en Valdmanis (1982) een $\log D_{ow}$ voor pentachlorofenol die met meer dan een factor drie varieerde, namelijk van 4.84 tot 1.30 over een pH-range van 1.2 tot 13.5 (zie Figuur 8). Voor een pH-waarde van 1 tot 5 daalde de schijnbare partitiecöfficiënt van 4.84 tot ongeveer 4.5. Boven pH 5 daalde deze sterker, vermoedelijk door ionisatie van het zwak zuur ($pK_a = 4.8$). Bij pH 9 werd een verdere sterke daling geconstateerd voor een relatief kleine toename van de pH. De oorzaak van deze terugval met ongeveer 1.5 log eenheden is niet duidelijk. Volgens het algemeen verband tussen ionisatie, pK_a en pH, is pentachlorofenol bij pH 9 voor 99.99% geïoniseerd, vergeleken bij pH 8 is dat 99.94%. De kleine verandering in ionisatie kan niet verantwoordelijk zijn voor de geobserveerde wijziging. Hypothesen welke dit fenomeen kunnen verklaren zijn een verandering in de hydratatie van pentachlorofenol of de vorming van pentachlorofenolaat-natrium complexen. De $\log D_{ow}$ bereikt een minimum van 1.3 bij een pH van 10.5. Verdere toename van de pH resulteert in een sterke stijging. Bij pH 13.5 bereikte deze een log-waarde van 3.9. De sterke stijging zou het resultaat zijn van een toename in ionische sterkte van de waterige fase met de pH. Deze interpretatie werd ondersteund door een afzonderlijke bepaling van de partitiecöfficiënt bij pH 10.5 bij een hogere ionische sterkte van 1.0, welke een waarde gaf van 2.4 vergeleken bij deze bij een ionische sterkte van 0.01 van 1.3.



Figuur 8. Schijnbare octanol-water partitiecöfficiënt van pentachlorofenol in functie van de pH van de waterige fase (Kaiser en Valdmanis, 1982)

Johnson en Westall (1990) onderzochten het effect van de pH op de distributie van methylanilines tussen octanol en water bij KCl concentraties van 0.05, 0.1, 0.15 en 0.20 M. Daaruit kwam naar voor dat bij hoge pH de neutrale vorm B van de methylanilines dominant is zowel in de waterige als in de octanolfase. De distributie is onafhankelijk van de pH en de ionische sterkte van de waterige fase en D_{ow} is gelijk aan K_{ow} . Bij intermediaire pH zou de geprotoneerde vorm BH^+ dominant zijn in de waterige fase, terwijl de neutrale vorm zou domineren in de octanolfase. De $\log D_{ow}$ waarde neemt lineair af met de $\log a_{H^+}$ (a :activiteit). Bij lage pH zou de geprotoneerde vorm van de methylanilines dominant zijn in beide fasen. De $\log D_{ow}$ waarde is dan onafhankelijk van de pH, maar stijgt met de KCl concentratie. De afhankelijkheid van de zoutconcentratie is volgens de auteur te wijten aan de transfer van het anilinium ion van water naar de octanolfase met het Cl^- tegenion. Zowel vrije ionen als ionenparen zouden bijdragen bij tot dit effect. Opvallend is dat het ongesubstitueerde anilinium ion niet in de organische fase gaat boven pH 2 en een ionische sterkte van 0.1 M.

4.3. Experimentele bepaling van schijnbare octanol-water partitievoëfficiënten

De schijnbare octanol-water partitievoëfficiënten werden bepaald volgens de "shake flask" methode. Dit is de klassieke methode, waarbij het produkt toegevoegd wordt aan een twee fasen systeem bestaande uit een water verzadigde organische (1-octanol) fase en een octanol verzadigde waterige fase, waarvan de volumeverhouding is aangepast aan de verwachte waarde voor de distributieverhouding. De optimale volumeverhouding voor een gegeven systeem wordt vooraf experimenteel bepaald, door voor een aantal verschillende volumeverhoudingen de volledige procedure uit te voeren. De organische fase (1-octanol) wordt verzadigd met water door een bepaald volume organische fase 24h op de gewenste temperatuur (25°C) te laten schudden met een bepaald volume waterige fase en vervolgens 5 min. te centrifugeren bij 2500 omwentelingen per minuut. De water verzadigde octanol fase wordt dan afgepipeteerd. Op analoge wijze wordt de waterige fase verzadigd met de organische fase (OECD, 1995).

Na het verzadigen van beide fasen worden deze onder een bepaalde volumeverhouding in glazen flesjes gebracht waar dan een bepaalde hoeveelheid radioactieve (^{14}C -gelabeld)

organische component aan toegevoegd wordt. De glazen flesjes worden gedurende 24h geschud bij de gewenste temperatuur (25°C) en vervolgens gedurende 5 min. gecentrifugeerd bij 2500 omwentelingen per minuut. Daarna wordt een monster genomen van de fase met het grootste volume en wordt die hoeveelheid afgewogen. Na het toevoegen van een bepaalde hoeveelheid scintillatievloeistof en het schudden van de stalen wordt dan de hoeveelheid radioactiviteit gemeten. Het principe van de vloeistofscintillatie is gebaseerd op het feit dat de solventmoleculen, aanwezig in de scintillatievloeistof, geëxciteerd worden door de kinetische energie die vrijkomt bij de radioactieve desintegratie. Deze solventmoleculen geven hun energie door aan fluormoleculen die bij de terugkeer naar hun grondtoestand licht uitzenden. De uitgezonden fotonen worden gedetecteerd en omgezet in elektrische stroom door een fotomultiplier. Uit de gemeten hoeveelheid radioactiviteit kan vervolgens de verhouding van de concentraties berekend worden. Daar op deze manier de totale analytische concentratie wordt gemeten, wordt aldus de distributieverhouding D bekomen. Deze wordt bepaald bij verschillende waarden voor pH en saliniteit.

De $\log D_{ow}$ werd bepaald bij 25°C in functie van de pH (6, 7, 8) en de saliniteit (1, 10, 20, 30, 40 g.l⁻¹). Er werd gewerkt met chemisch gedefinieerd zeewater (Tabel 2) en verdunningen hiervan. Gedurende de 96h-LC₅₀ bepalingen (zie hoofdstuk 5) en gedurende de opname-experimenten (zie hoofdstuk 6) werd het water gebufferd om de pH constant te houden door toevoegen van 10 mM zwitterionische buffers. Om de distributiecoëfficiënt onder dezelfde omstandigheden te bepalen als waarin de overige experimenten werden uitgevoerd, werd ook hiervoor dezelfde buffer gebruikt. Bij pH 6 werd MES (2-[N-Morpholino]ethaansulfonzuur), bij pH 7 MOPS (3-[N-Morpholino]propaansulfonzuur en bij pH 8 EPPS (N-[2--Hydroxyethyl]piperazine-N'-[3-propaanzuur]) (Sigma) toegevoegd en eventueel aangepast met 1 M HCl of NaOH. Om na te gaan of de beschouwde component gebonden wordt door de in het water aanwezige buffer en op die manier de resultaten zou beïnvloeden, werd de $\log D_{ow}$ bepaald met water van twee verschillende buffercapaciteiten namelijk 1 mM en 10 mM. De metingen bij een buffercapaciteit van 1 mM werden enkel uitgevoerd bij pH 6, 7 en 8 en bij saliniteit 1, 10 en 30 g.l⁻¹.

Tabel 2. Samenstelling voor chemisch gedefinieerd zeewater

Component	Concentratie (g.l ⁻¹)
NaCl	23.50
Na ₂ SO ₄	4.00
KCl	0.680
NaHCO ₃	0.196
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.470
MgCl ₂ .6H ₂ O	10.78
H ₃ BO ₃	0.026

Daar uit literatuurgegevens omtrent de K_{ow} bleek dat *pentachlorofenol* (Sigma) zich voornamelijk in 1-octanol verdeelt, werd voor een volumeverhouding van 1/10 of 250 μ l 1-octanol/2500 μ l water geopteerd. Daaraan werd 2.5 μ g ¹⁴C-gelabelde pentachlorofenol of 0.1 μ Ci toegevoegd. Een monster (ongeveer 2 ml) werd afgepipeteerd van de waterige fase en gewogen, waarna 10 ml ULTIMA GOLD-XR (Canberra Packard, Meriden, USA) werd toegevoegd. Voor iedere conditie werden 5 herhalingen gemeten. Berekening van de massabalans toonde aan dat de fout hierop binnen de range van de experimentele fout ligt (minder dan 10%). Na 24h schudden werd dan de hoeveelheid radioactiviteit in de waterige fase gemeten met een β -teller van het type Tri-Carb Liquid Scintillation Analyzers Model 1900TR (Canberra Packard). De telling voor ¹⁴C gebeurt in een energiespectrum tussen 0 en 156 keV.

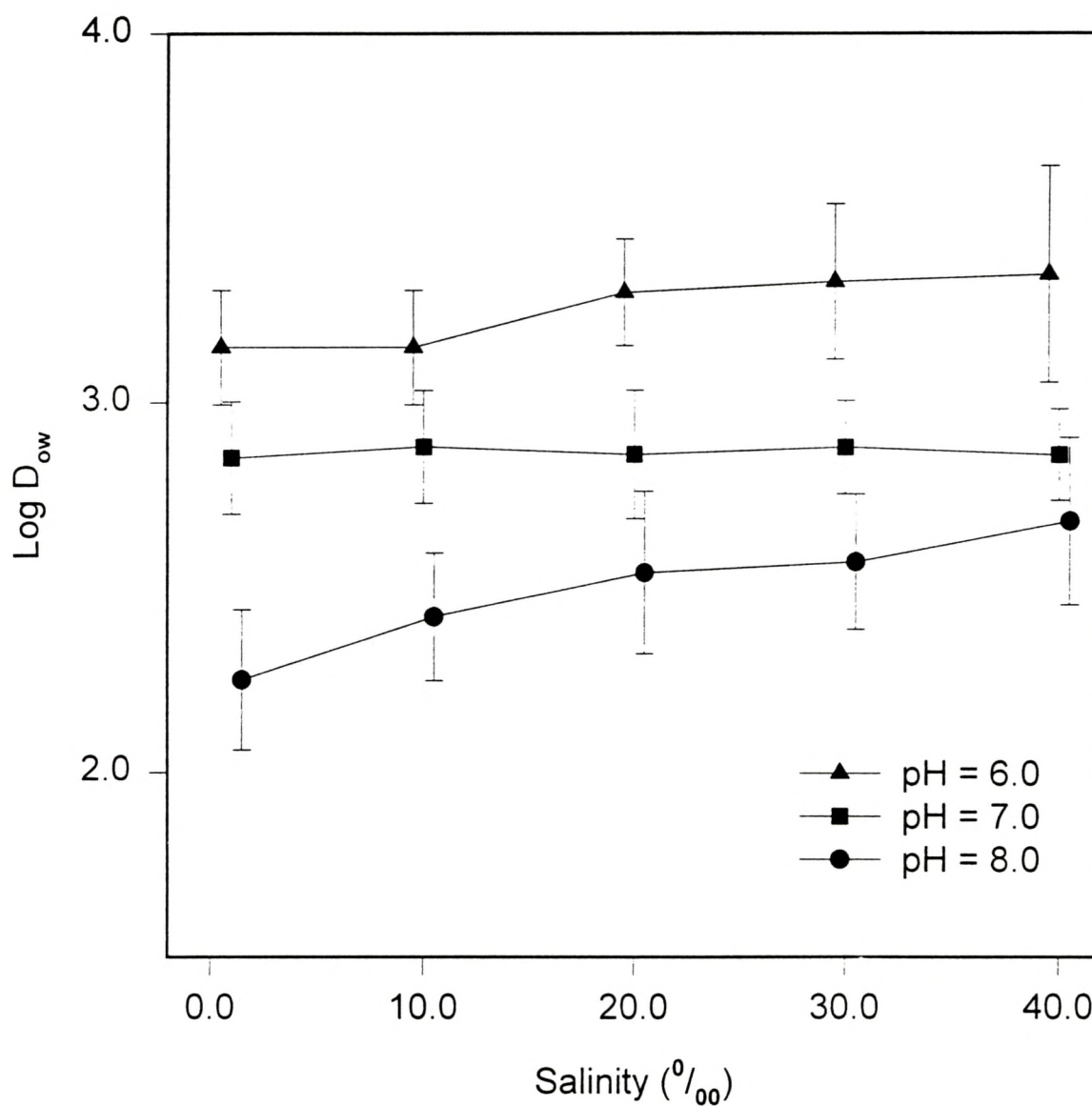
In sterk zuur milieu komt pentachlorofenol voor als neutraal species met sterk lipofiel karakter. De log van de distributiecoëfficiënt bedraagt in dat geval ongeveer 5.0 (Westall et al., 1985) en is in feite de log K_{ow} van pentachlorofenol. Het verloop van de distributiecoëfficiënt in functie van de saliniteit is weergegeven in Figuur 9. De distributiecoëfficiënt stijgt met toenemende saliniteit als gevolg van de vorming zoutpentachlorofenolaatcomplexen. De distributiecoëfficiënt stijgt eveneens wanneer de

zuurtegraad daalt, daar er bij lage pH een groter aandeel ongedissocieerd pentachlorofenol aanwezig is dan bij hoge pH (zie Figuur 4-6). Uit de resultaten bleek ook dat er geen significant verschil was tussen de verschillende buffercapaciteiten.

Ook *1,2,4-trichlorobenzeen* (> 98%, Sigma) verdeelt zich hoofdzakelijk in de octanolfase, vandaar dat ook hier gemeten werd in de waterige fase en bij een volumeverhouding van 1/5. Er werd 10 μg of 0.1 μCi 1,2,4-trichlorobenzeen toegevoegd. De metingen geschieden eveneens in vijfvoud en op analoge wijze als voor pentachlorofenol. Daar 1,2,4-trichlorobenzeen een niet-speciërende verbinding is, verwacht men niet dat de buffercapaciteit een invloed zal hebben op de partiticoëfficiënt en meet men bovendien rechtstreeks de K_{ow} . De log K_{ow} wijzigde niet voor de verschillende condities en bedraagt 3.9 ± 0.2 , wat goed overeenkomt met de waarde die men terugvindt in de literatuur, namelijk 4.050 ± 0.018 (De Bruijn et al., 1989).

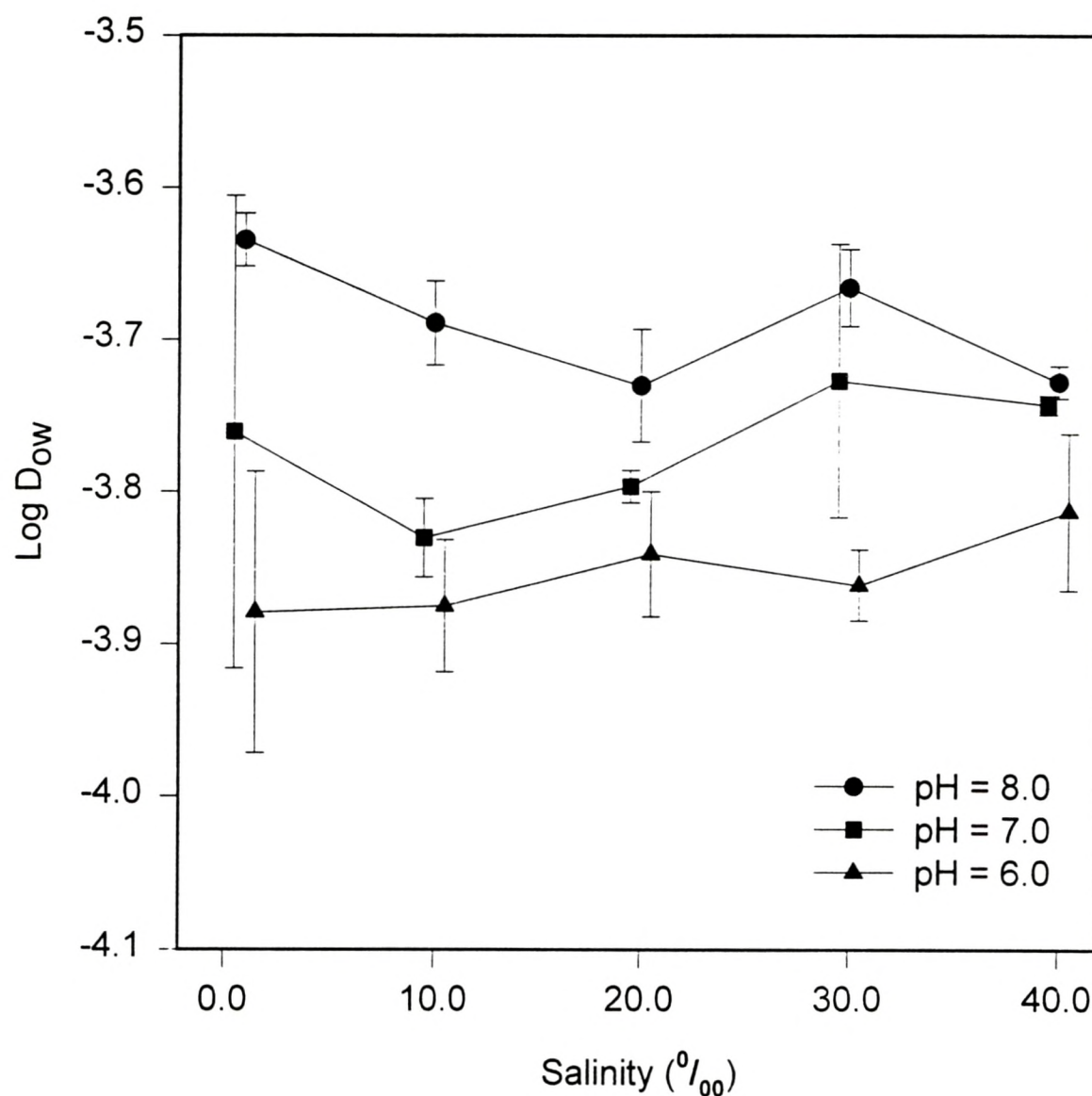
In tegenstelling tot de twee hoger vermelde produkten, verdeelt *diquat* (> 98.9%, Amersham) zich voornamelijk in de waterige fase, waardoor men de volumeverhouding van 10/1 of 1000 μl 1-octanol/100 μl water moet hanteren om een meetbare hoeveelheid radioactiviteit te bekomen. De hoeveelheid diquat die werd toegevoegd bedroeg 1.58 μg of 0.250 μCi . De meting gebeurde in octanol na toevoeging van 10 ml OPTIFLUOR-O (Canberra Packard). Ook hier werden de experimenten uitgevoerd bij twee verschillende buffercapaciteiten, namelijk 1mM (pH 6, 7, 8 en saliniteit 1, 10, 30 g.l^{-1}) en 10 mM (pH 6, 7, 8 en saliniteit 1, 10, 20, 30, 40 g.l^{-1}). Opnieuw werd geen significant verschil waargenomen tussen de verschillende buffercapaciteiten. De log D_{ow} van diquat in functie van de saliniteit voor de verschillende pH-waarden wordt weergegeven in Figuur 10. Daaruit blijkt dat de D_{ow} stijgt met stijgende pH, waarschijnlijk te wijten aan het feit dat diquat hydrolyseert bij alkalische pH (Tomlin, 1994). Daar men echter niet beschikt over de pK_a van deze verbinding is het moeilijk om hier conclusies uit te trekken. De invloed van de saliniteit daarentegen is niet significant.

**Log D_{ow} of pentachlorofenol as function of salinity
(Buffercapacity = 10 mM)**



*Figuur 9. Log D_{ow} van pentachlorofenol bij 25°C in functie van de saliniteit
De foutenvlaggen zijn standaarddeviaties*

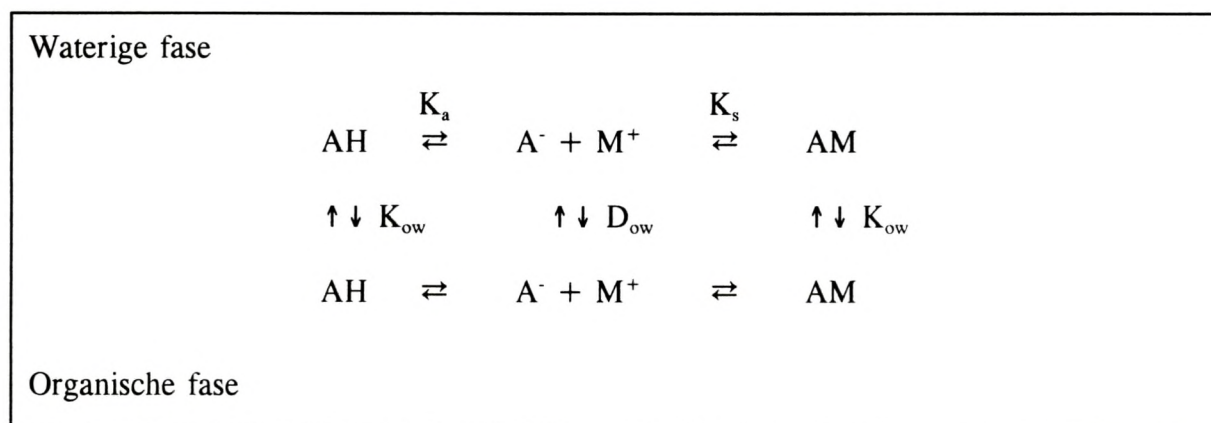
**Log D_{ow} of diquat as function of salinity
(Buffercapacity = 10 mM)**



*Figuur 10. Log D_{ow} van diquat bij 25°C in functie van de saliniteit
De foutenvlaggen zijn standaarddeviaties*

4.4. Meerfase model

Wanneer de speciatie van een bepaald pollutant gekend is en de distributieverhouding als functie van de pH en saliniteit werd bepaald, dan kan een meerfase model geconstrueerd worden dat de invloed van de speciatie op de verdeling van contaminanten tussen een organische en een waterige fase beschrijft. Hierbij wordt voor een zure component uitgegaan van volgend schema (Weidenhaupt, 1994):



Voor dit systeem kan een distributieverhouding worden gedefinieerd als:

$$D_{ow} = \frac{[\text{concentratie van alle vormen van de oktanolphase (o)}]}{[\text{concentratie van alle vormen van de waterige fase (w)}]}$$

of nog

$$D_{ow} = \frac{[A]_{tot,o}}{[A]_{tot,w}}$$

met

$$[A]_{tot} = [AH] + [(A^-)(M^+)] + [AM]$$

De aldus gedefinieerde partitiecöefficient is vanzelfsprekend geen constante, maar hangt af van de omgevingsfactoren zoals pH, aard en concentratie van de voorhanden zijnde tegenionen. Voor elke afzonderlijke neutrale vorm kan echter een partitiecöefficient gedefinieerd worden:

$$K_{ow,AM} = \frac{[AM]_o}{[AM]_w}$$

Dissocieerbare verbindingen vormen met tegenionen ionenparen die zich gemakkelijker in de organische fase verdelen als de vrije anionen. Voor de anionische vorm kan derhalve slechts een distributieverhouding $D_{ow,(A^-)(M^+)}$ gedefinieerd worden welke van de aard en de concentratie van de voorhanden zijnde tegenionen afhangt. In aanwezigheid van lage concentraties van zwak associërende tegenionen streeft deze distributieverhouding toch naar een constante waarde:

$$\lim_{[M^+] \rightarrow 0} D_{ow,(A^-)(M^+)} = \text{const.} \equiv K_{ow,A^-}$$

Onder deze omstandigheden kan de solvent-water distributieverhouding voor de totale concentratie opnieuw geformuleerd worden als:

$$D_{ow} = \frac{[AH]_w}{[A]_{tot,w}} \cdot \frac{[AH]_o}{[AH]_w} + \frac{[A^-]_w}{[A]_{tot,w}} \cdot \frac{[(A^-)(M^+)]_o}{[A^-]_w} + \frac{[AM]_w}{[A]_{tot,w}} \cdot \frac{[AM]_o}{[AM]_w}$$

met

$$f_{AM} = \frac{[AM]_w}{[A]_{tot,w}}$$

Dit resulteert in:

$$D_{ow} = f_{AH} \cdot K_{ow,AH} + f_{A^-} \cdot K_{ow,A^-} + f_{AM} \cdot K_{ow,AM}$$

Wanneer D_{ow} experimenteel werd bepaald voor verschillende condities van saliniteiten en pH en de speciatie bekend is, kunnen de verschillende partitievoëfficiënten worden bepaald op basis van de som van de kleinste kwadraten algoritme. Het is dan mogelijk, bij bekende watersamenstelling en bekende vormingsconstanten, de solvent-water distributieverhouding te voorspellen. Een dergelijk model werd reeds op succesvolle wijze aangewend ter verklaring van de octanol-water verdeling van methylkwiksilver verbindingen (Faust, 1992) en van trialkyltin verbindingen (Weidenhaupt, 1994).

Wanneer het bovenstaande meergefase model wordt toegepast op *pentachlorofenol*, dan wordt de volgende uitdrukking bekomen:

$$D_{ow} = f_{HPCP} \cdot K_{ow,HPCP} + f_{PCP^-} \cdot K_{ow,PCP^-} + f_{NaPCP} \cdot K_{ow,NaPCP} + f_{KPCP} \cdot K_{ow,KPCP} + f_{CaPCP^+} \cdot K_{ow,CaPCP^+} + f_{MgPCP^+} \cdot K_{MgPCP^+}$$

Aan de hand van de experimenteel bepaalde distributieverhoudingen (bij verschillende condities) werd getracht de verschillende partiticoëfficiënten te schatten. De fracties van de verschillende pentachlorofenol species voor de verschillende condities worden berekend aan de hand van het speciatiemodel en kunnen worden gedefinieerd op basis van de concentraties en op basis van de activiteiten. De optimalisatie gebeurde door multiple lineaire regressie met behulp van STATISTICA (StatSoft Inc., Tulsa).

Wanneer enkel de niet-gedisassocieerde vorm in de analyse betrokken wordt m.a.w.:

$$D_{ow} = f_{HPCP} \cdot K_{ow,HPCP}$$

dan wordt een regressiecoëfficiënt r^2 van 0.39* ($0.05 \geq p > 0.01$) bekomen op basis van de concentratie HPCP en een r^2 van 0.48** ($0.01 \geq p > 0.001$) aan de hand van de activiteit van de ongedissocieerde vorm. De lage waarde voor r^2 toont aan dat naast de ongedissocieerde vorm hoogst waarschijnlijk ook andere vormen overgaan van de waterige fase naar de octanolfase.

Worden de verschillende zoutfenolaatcomplexen in de analyse betrokken, dus:

$$D_{ow} = f_{HPCP} \cdot K_{ow,HPCP} + f_{NaPCP} \cdot K_{ow,NaPCP} + f_{KPCP} \cdot K_{ow,KPCP} + f_{CaPCP^+} \cdot K_{ow,CaPCP^+} + f_{MgPCP^+} \cdot K_{MgPCP^+}$$

dan blijkt het onmogelijk de partiticoëfficiënten voor elk van de zoutvorm te bepalen op basis van de gegeven dataset. De reden hiervoor ligt in het feit dat de verschillende

zoutfenolaatcomplexen als functie van de saliniteit en de pH covariëren.

Het bleek wel mogelijk een globale distributiecoëfficiënt voor de verschillende zoutvormen samen te bepalen aan de hand van volgende uitdrukking:

$$D_{ow} = f_{HPCP} \cdot K_{ow,HPCP} + F_{MPCP} \cdot D_{ow,MPCP}$$

met

$$F_{MPCP} = f_{NaPCP} + f_{KPCP} + f_{CaPCP^+} + f_{MgPCP^+}$$

Wanneer zowel de concentratie van de ongedissocieerde vorm als van de zoutcomplexen in rekening wordt gebracht, verklaart dit model 82 %*** ($p \leq 0.001$) van de variatie. Men bekomt dan een $\log K_{ow}$ voor HPCP van 4.65 ± 0.04 en een $\log D_{ow}$ voor de zoutcomplexen van 3.56 ± 0.07 . De aan de hand van bovenstaand model geschatte $\log K_{ow}$ ligt lager dan de waarde van 5.01 (Westall et al., 1985) die men in de literatuur terugvindt.

Werkt men eenzelfde analyse uit aan de hand van de activiteiten, dan bekomt men eenzelfde $\log K_{ow}$ voor HPCP van 4.65 ± 0.04 . Voor de zoutvorm vindt men dan een $\log D_{ow}$ van 3.59 ± 0.08 . Er wordt dan 84 %*** ($p \leq 0.001$) van de variatie verklaard. Dit betekent dat de zoutfenolaatcomplexen wel degelijk in de octanolfase overgaan. De eigenlijke partiticoëfficiënten voor de verschillende zoutfenolaatcomplexen konden echter niet worden bepaald. Jafvert et al. (1990) konden echter wel de $\log K_{ow}$ voor de verschillende zoutfenolaatcomplexen bepalen daar ze de partiticoëfficiënten bepaalden met chemisch gedefinieerd zeewater waar telkens één component in een stijgende concentratie was toegevoegd. Ze bekwamen voor kaliumpentachlorofenolaat een $\log K_{ow}$ van 2.64, voor natriumpentachlorofenolaat één van 2.68. Voor $MgPCP^+$ vond Jafvert een \log waarde van -0.254, wat erop wijst dat deze vorm weinig of niet overgaat naar octanol.

Wanneer ook de ongedissocieerde vorm in de analyse wordt betrokken, dus:

$$D_{ow} = f_{HPCP} \cdot K_{ow,HPCP} + f_{PCP^-} \cdot K_{ow,PCP^-} + F_{MPCP} \cdot D_{ow,MPCP}$$

dan blijkt de K_{ow} van de gedissocieerde vorm (PCP^-) niet significant, wat erop duidt dat deze vorm zich niet over de octanolfase verdeelt of slechts in geringe mate bijdraagt tot de schijnbare partitievoëfficiënt.

Finaal wordt dus volgende uitdrukking bekomen voor de distributieverhouding als functie van de pH en de saliniteit:

$$D_{ow} = 10^{-4.65} \cdot f_{HPCP} + 10^{-3.56} \cdot F_{MPCP}$$

Deze uitdrukking, waarbij f de fractie van de concentraties van de respectievelijk vormen voorstelt, liet toe 82 % van de variatie te verklaren. De resterende variatie is waarschijnlijk het resultaat van de verschillen tussen de werkelijke speciatie en de berekende speciatie en verschillen tussen de werkelijke en analytisch bepaalde distributievoëfficiënten.

De belangrijkste conclusie is dat naast het ongedissocieerde pentachlorofenol ook de zoutpentachlorofenolaatcomplexen in brak-en zeewater in belangrijke mate bijdragen tot de octanol-water distributievoëfficiënt. Verdere experimentele data moeten het echter mogelijk maken dit meergefase model verder te verfijnen en de parameters adequater te bepalen.

De K_{ow} van *diquat* kon niet geschat worden daar er geen vooralsnog gegevens voorhanden zijn omtrent de speciatie van diquat.

5. BEPALING VAN DE ACUTE TOXICITEIT (96h-LC₅₀ WAARDEN)

De 96h-LC₅₀ waarde is de concentratie waarbij 50% van de vissen (LC₅₀) na 96h sterven en wordt beschouwd als een maat voor de acute toxiciteit van een component. De bedoeling is na te gaan hoe de toxiciteit beïnvloed wordt door pH en saliniteit. De 96h-LC₅₀ waarden worden bepaald bij geacclimatiseerde juveniele (ongeveer 8 weken oude) sheepshead minnow bij $25.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ bij pH 6, 7 en 8 en bij saliniteit 1, 10 en 30 g.l⁻¹.

De proeven werden uitgevoerd met sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*) die behoort tot de familie van de Cyprinodontidae (eierleggende tandkarpertjes). Deze familie bevat 45 genera en 300 species die voorkomen in alle continenten, behalve in Australië. De meeste species zijn zoetwater species maar sommige komen ook voor in brak en kust zeewater. Sheepshead minnow is de enige mariene species en komt veelvuldig voor in het kustwater van de Atlantische oceaan en de Golf van Mexico. Het zijn scholende, euryhaline species die een variëteit van ondiepe waters bevolken. Ze zijn tolerant aan extreme veranderingen in water temperatuur, gaande van 0-40°C en in saliniteiten gaande van 0.01 tot 14.9 ‰ (Simpson en Grunter, 1956; Nordlie, 1987). Ze zijn een belangrijke component in het estuariene ecosysteem, waarin ze als tussenschakel voor de overdracht van energie fungeren tussen de lagere trofische niveaus en de carnivoren in de hogere trofische niveaus. Deze soort wordt algemeen aanvaard als testorganisme door het EPA (Environmental Protection Agency) en wordt internationaal gebruikt in ecotoxicologisch onderzoek (EPA, 1993).

De vissen, aangekocht bij Charles River Aquatics (Nederland), werden gedurende 10 dagen geacclimatiseerd in water bij dezelfde condities als deze waarin de uiteindelijke toxiciteitstest zal plaatsvinden (OECD, 1995). Om de pH gedurende de acclimatisatie constant te houden, werd gebruik gemaakt van biologische zwitterionbuffers, namelijk 10 mM MES bij pH 6, 10 mM MOPS bij pH 7 en 10 mM EPPS bij pH 8. Het acclimatisatiemedium bestaat uit chemisch gedefinieerd zeewater (Tabel 2) en verdunningen daarvan en is voorzien van een filter. Bovendien werd het medium voortdurend belucht zodat het gehalte aan opgeloste zuurstof in het water zeker hoger is dan 5 mg.l⁻¹ (60 % verzadigd) (EPA, 1993). Een dag/nachtregime van 12h licht en 12h donker werd gehanteerd en de vissen werden dagelijks gevoed met *Daphnia magna*, behalve 24h voor het begin van de test (OECD, 1995). Re-

gelmatig werd het water gecontroleerd op het NO_2^- , NO_3^- en NH_3 gehalte en deze mogen de waarde van respectievelijk 0.1 mg.l^{-1} , 20 mg.l^{-1} en 0.1 mg.l^{-1} niet overschrijden (EPA, 1993). Ook werd de pH regelmatig gecontroleerd en zonodig gecorrigeerd door NaOH of HCl bij te voegen. Indien gedurende de acclimatisatie vissen stierven, werden die onmiddellijk verwijderd. Om de experimenten uit te voeren bij een constante temperatuur van 25°C , werd gewerkt in een klimaatkast.

Het testmedium heeft dezelfde samenstelling als het acclimatisatiemedium, maar er is geen substraat en biologische filter voorzien om mogelijke sorptie aan het sediment en microbiële degradatie van de componenten te voorkomen. Ook wordt het water niet belucht om vervluchtiging te vermijden. Gedurende de proeven worden de vissen niet gevoed om het verlies aan componenten door adsorptie aan voedsel te minimaliseren. Tien vissen worden in 3 l in een statisch systeem blootgesteld aan een bepaalde concentratie en per conditie worden vijf concentraties in een geometrische reeks gekozen. Daarnaast werd ook voor iedere conditie een blanco-test uitgevoerd. Vooraf wordt een range-finding test uitgevoerd om makkelijker de uiteindelijke concentraties waarbij het experiment dient uitgevoerd te worden, te bekomen. Op regelmatige tijdstippen (zie Figuur 11) werd nagegaan hoeveel vissen doodgingen en dode vissen werden onmiddellijk verwijderd. Op basis van de sterftecijfers bij de verschillende blootstellingsconcentraties- en tijden werden concentratie-effect relaties bepaald. Hiervoor werden de gegevens telkens gefit aan een logistisch respons model met behulp van STATISTICA (StatSoft Inc., Tulsa). In alle gevallen bleek dit model de resultaten zeer goed te beschrijven. Uit deze relaties werd de 96h- LC_{50} berekend. Door de experimentele data te fitten aan een exponentieel model, kan eveneens de lethale concentratie waarbij 50% van de vissen sterft na een bepaalde blootstellingstijd berekend worden.

Voor *pentachlorofenol*, aangekocht bij SIGMA ($> 99\%$), werd de stockoplossing aangemaakt in ethanol p.a. (UCB) van 10 mg.ml^{-1} en werden de experimenten uitgevoerd binnen het concentratiebereik van 5 en $4000 \mu\text{g.l}^{-1}$. Een voorbeeld van de fitting van de experimentele data aan een logistisch respons model wordt weergegeven in Figuur 11 voor een respons na 96h, pH 8 en saliniteit van 30 g.l^{-1} . Het effect van de blootstellingstijd en de blootstellingscondities op de LC_{50} wordt weergegeven in Figuur 12 tot 14. De nominale 96h- LC_{50} waarden voor de verschillende condities worden gegeven in Tabel 3.

Tabel 3. De 96h-LC₅₀ van pentachlorofenol (mg/l) op sheepshead minnow (25°C)

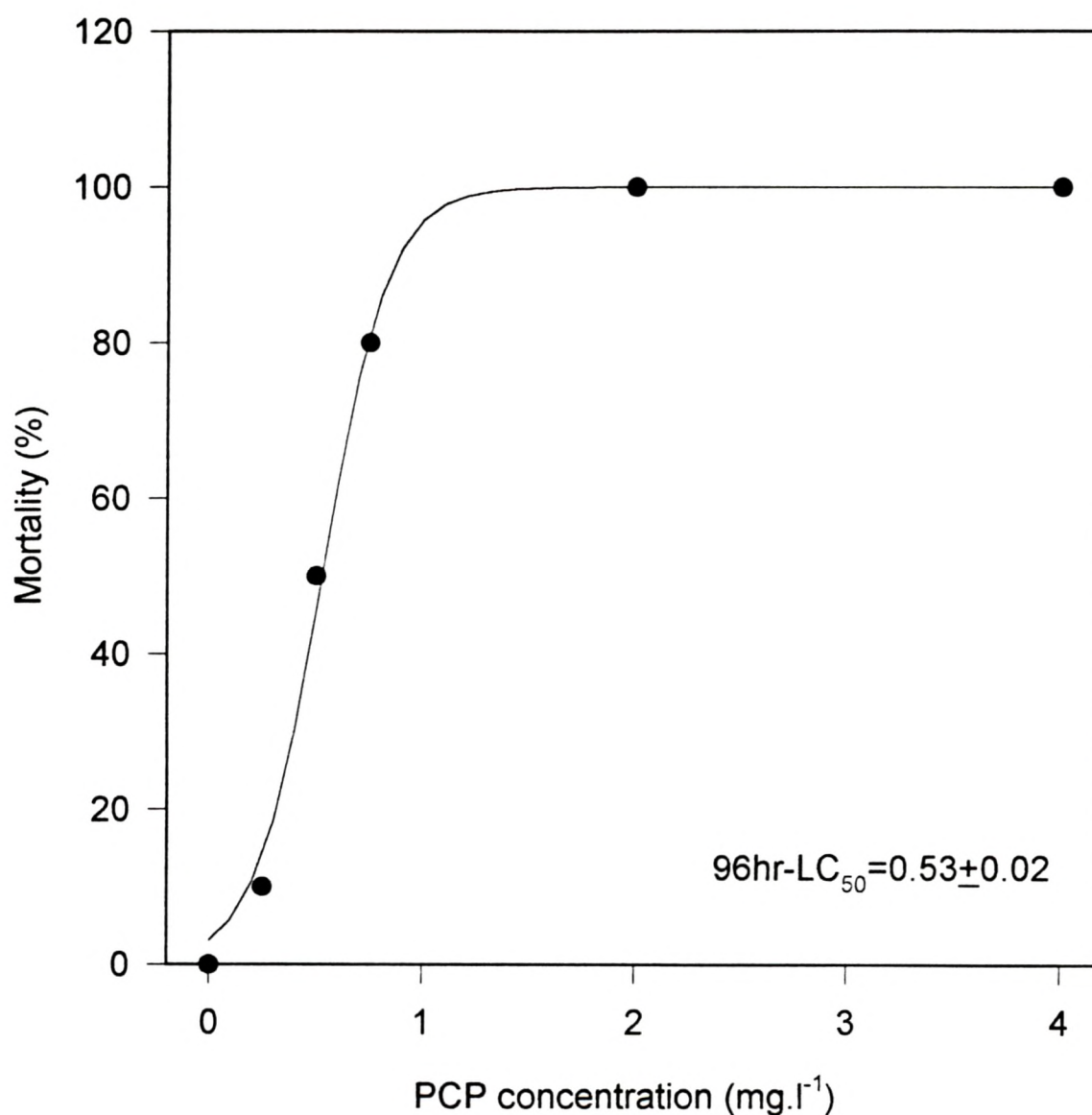
	Sal = 1 g.l ⁻¹	Sal = 10 g.l ⁻¹	Sal = 30 g.l ⁻¹
pH = 6	0.042	0.023	0.080
pH = 7	0.100	0.109	0.243
pH = 8	0.494	0.479	0.529

De gemeten 96h-LC₅₀ waarden voor sheepshead minnow zijn lager dan deze die Saarikoski en Viluksela (1981) vonden bij geacclimatiseerde *Poecilia reticulata* voor pentachlorofenol, wat betekent dat pentachlorofenol toxischer is voor sheepshead minnow. Zij vonden 96h-LC₅₀ waarden voor zoet water met een hardheid tussen de 80 en 100 ppm CaCO₃ van 0.0426 mg.l⁻¹ bij pH 5, 0.117 mg.l⁻¹ bij pH 6, 0.442 mg.l⁻¹ bij pH 7 en 0.910 mg.l⁻¹ bij pH 8. De toxiciteit is voor de drie zuurtegraden steeds het laagst bij een saliniteit van 30 g.l⁻¹. Bij saliniteten 1 en 10 g.l⁻¹ is de situatie minder éénduidig (zie Figuur 12 tot 14). Bij pH 8 is pentachlorofenol toxischer bij 1 dan bij 10 g.l⁻¹. Bij pH 7 is er geen verschil en bij pH 6 pentachlorofenol veel toxischer bij 10 dan bij 1 g.l⁻¹. In alle gevallen daalt de LC₅₀-waarde vrij sterk tijdens de eerste 48h blootstelling en bereikt in de meeste gevallen een plateau na 96h. Uit deze gegevens blijkt dat de toxiciteit niet meer dan met een factor 4 verandert met de saliniteit van het water. Houdt men ook rekening met de veranderingen in zuurtegraad dan verschillen de toxiciteiten met meer dan een factor 20. Zoals te verwachten is de toxiciteit van pentachlorofenol sterk afhankelijk van de speciatie. De 96h-LC₅₀ waarde daalt met stijgende activiteit van het neutrale pentachlorofenol en uit een multiple lineaire regressie met behulp van STATISTICA (StatSoft Inc., Tulsa) bleek dat de verandering in de activiteit van dit species 59%* (0.05 ≥ p > 0.01) van de waargenomen toxiciteit verklaart. De verandering van de concentratie van het ongedissocieerde pentachlorofenol verklaart 60%* (0.05 ≥ p > 0.01) van de waargenomen toxiciteit. Het verband tussen de 96h-LC₅₀ en de speciatie wordt ook weergegeven in Figuur 15 tot 17. De variatie daalt niet verder wanneer andere species zoals natriumpentachlorofenolaat in de analyse worden betrokken. Enerzijds kan dit erop wijzen dat andere species niet of weinig bijdragen tot de toxiciteit en dat de zuurtegraad en saliniteit van het water een bijkomend fysiologisch effect hebben bij de vissen op de toxiciteit van pentachlorofenol. Anderzijds kan de lage regressiecoëfficiënt er ook op

wijzen dat hier ook andere factoren een rol spelen die niet rechtevreeks samenhangen met de speciatie of de gevoeligheid van het organisme. Zo vonden Saarikoski en Viluksela (1981) dat het pentachlorofenolaat in zoet water met een hardheid tussen de 80 en 100 ppm CaCO_3 wel bijdraagt tot de toxiciteit en dat de toxiciteit van het pentachlorofenolaat ion niet constant was, maar daalde bij stijgende pH. Het is theoretisch namelijk zo dat door een stijging van de pH de oppervlakte potentiaal van de buitenste membranen van de epitheelcellen negatiever wordt, waardoor de permeabiliteit voor zowel organische als voor anorganische ionen kleiner wordt (Wright en Diamond, 1968; Deuticke, 1977). Een toename van de pH kan eveneens een shift veroorzaken van de potentiaal gradiënt over de kieuwmembraan in een negatieve richting (McWilliams en Potts, 1978), waardoor de diffusie van het fenolaat ion verhinderd wordt zonder dat de absorptie van de ongeladen vorm beïnvloed wordt. Hieruit blijkt dus dat de pH een invloed kan hebben op de opname van de gedissocieerde vorm zodat de opname van die vorm niet constant is over het gehele bestudeerde pH-gebied. Bovendien bestaat de mogelijkheid dat de vissen bij bepaalde condities gevoeliger zijn aan pentachlorofenol doordat ze minder goed tegen die pH en/of saliniteit kunnen. Dit wordt nagegaan door het berekenen van kritische lichaamsresidues. De kritische lichaamsresidues geven de concentratie weer die in het organisme aanwezig is bij mortaliteit. Wanneer deze concentratie niet voor alle condities dezelfde is, dan kan men daaruit besluiten dat sheepshead minnow minder bestand is tegen die bepaalde conditie waardoor pentachlorofenol voor die conditie toxischer is. Vandaar dat het afleiden van de toxiciteit uit opnamegegevens met omzichtigheid moet gebeuren. De kritische lichaamsresidues worden uitgebreid besproken in hoofdstuk 6.

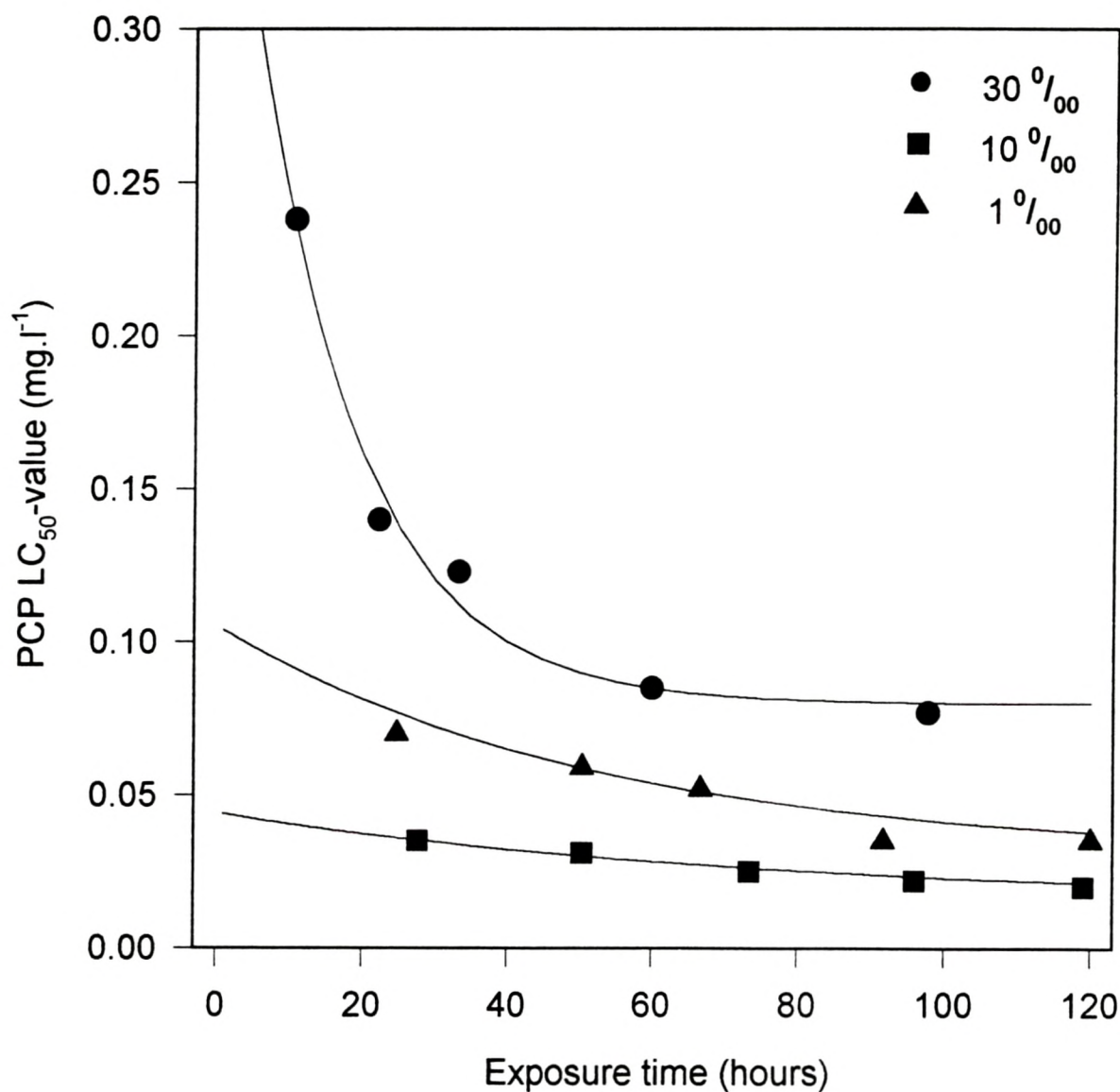
Het verband tussen de 96h-LC₅₀ en de D_{ow} van pentachlorofenol wordt gegeven in Figuur 18. Daaruit blijkt dat er een exponentieel verband bestaat tussen beide waarvan de distributiecoëfficiënt 86%*** ($p \leq 0.01$) van de waargenomen toxiciteit verklaart.

**Mortality of sheepshead minnow after 96 hr exposure to PCF
(pH=8.0, Sal=30‰, T=25°C)**



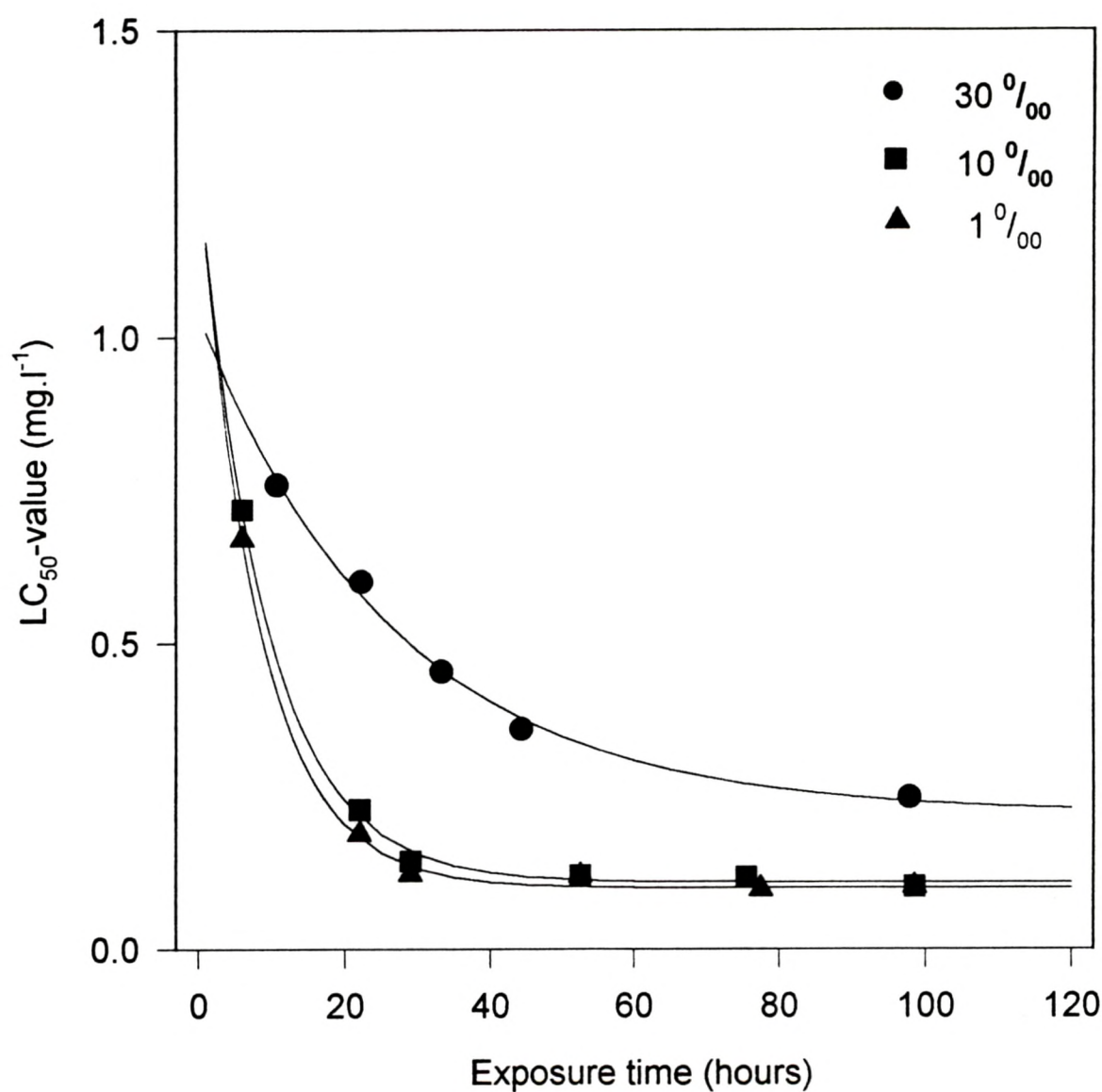
Figuur 11. Mortaliteit van sheepshead minnow na 96h blootstelling aan pentachlorofenol

**Effect of exposure time on sheepshead minnow LC_{50} for PCP
(pH=6, Sal=1-10-30‰, T=25°C)**



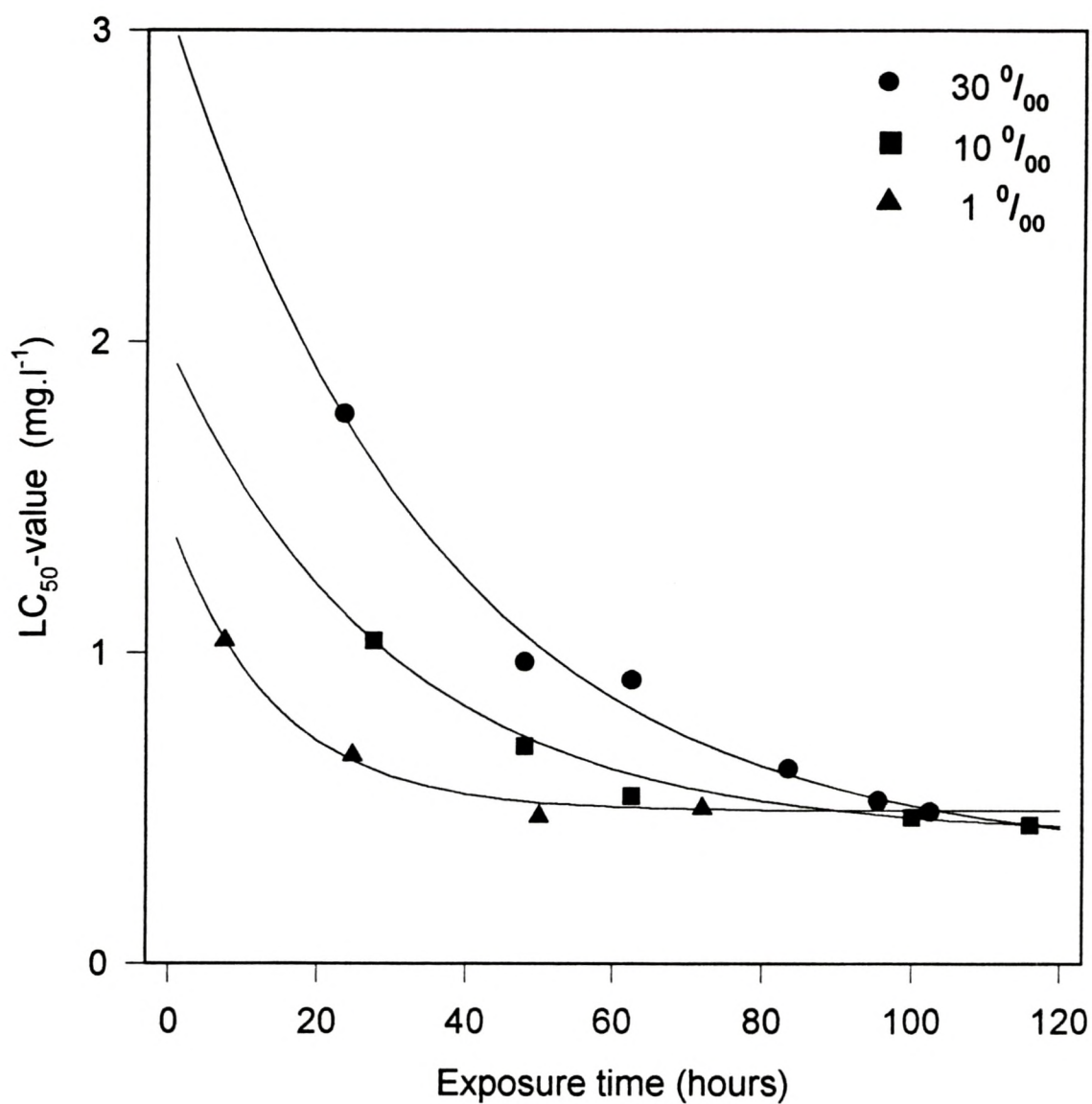
Figuur 12. Effect van de blootstellingstijd op de LC_{50} voor pentachlorofenol bij pH 6

**Effect of exposure time on sheepshead minnow LC_{50} for PCF
(pH=7, Sal=1-10-30‰, T=25°C)**



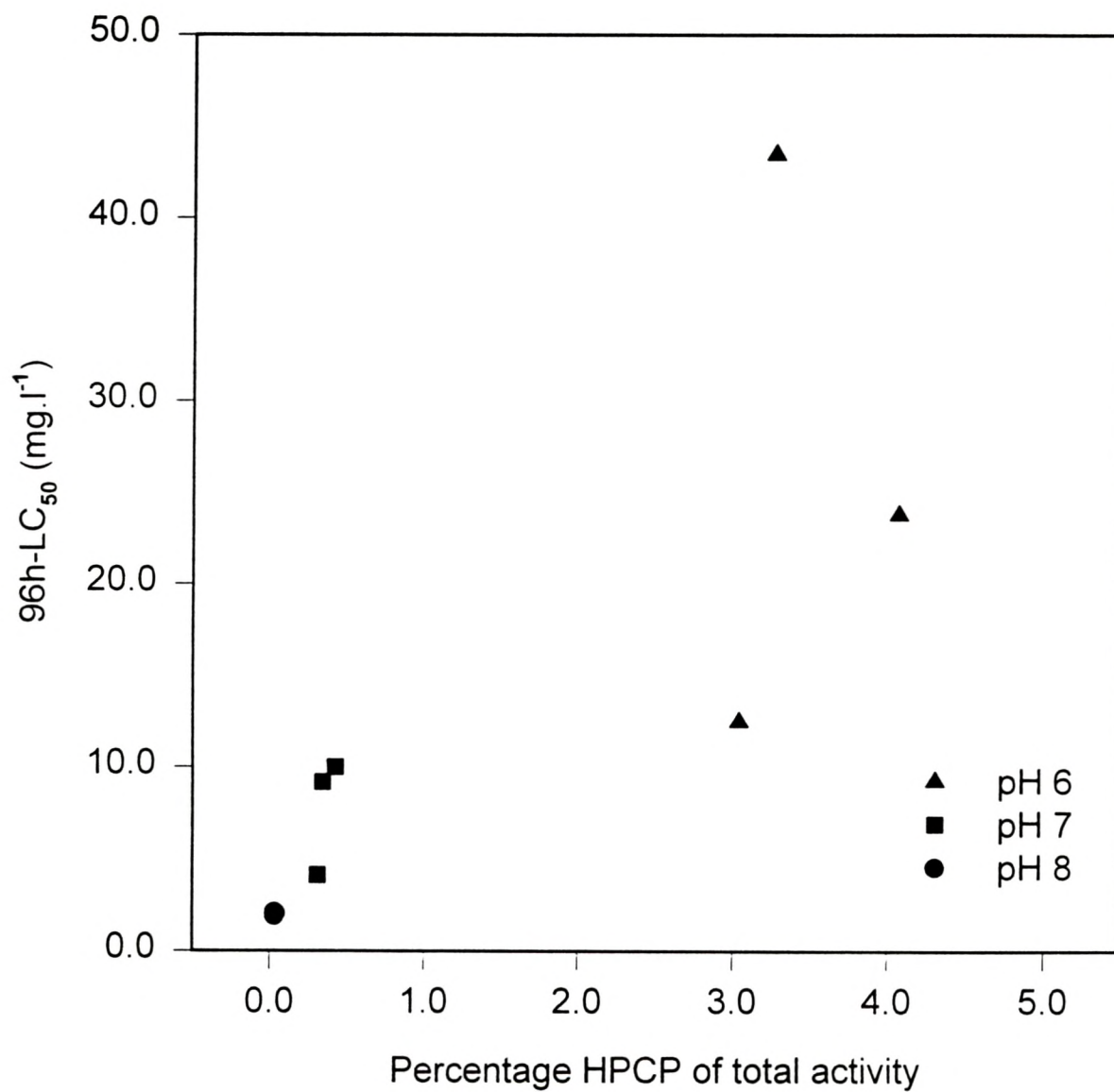
Figuur 13. Effect van de blootstellingstijd op de LC_{50} voor pentachlorofenol bij pH 7

**Effect of exposure time on sheepshead minnow LC_{50} for PCP
(pH=8, Sal=1-10-30‰, T=25°C)**



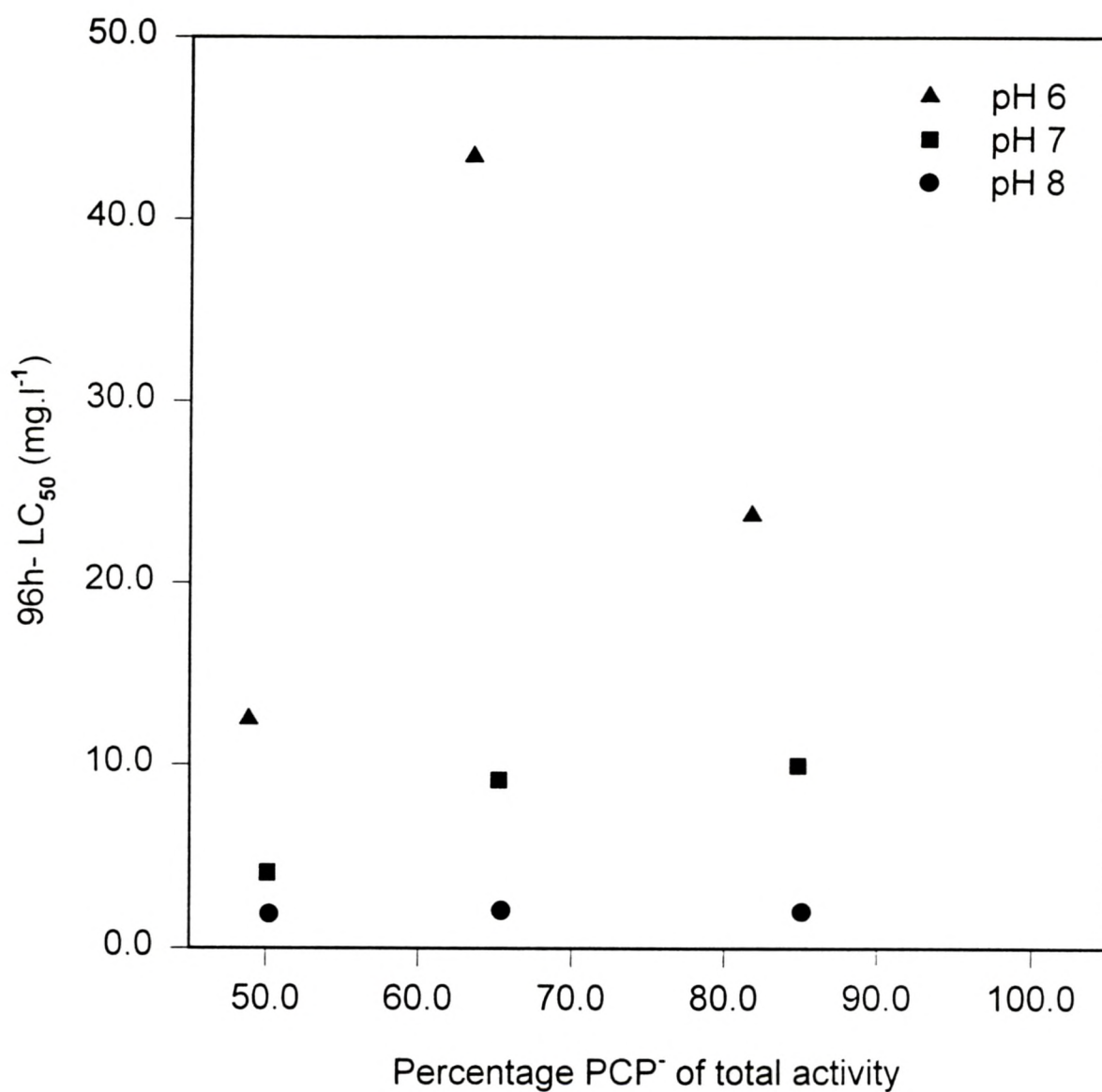
Figuur 14. Effect van de blootstellingstijd op de LC_{50} voor pentachlorofenol bij pH 8

96hLC₅₀-HPCP relationship



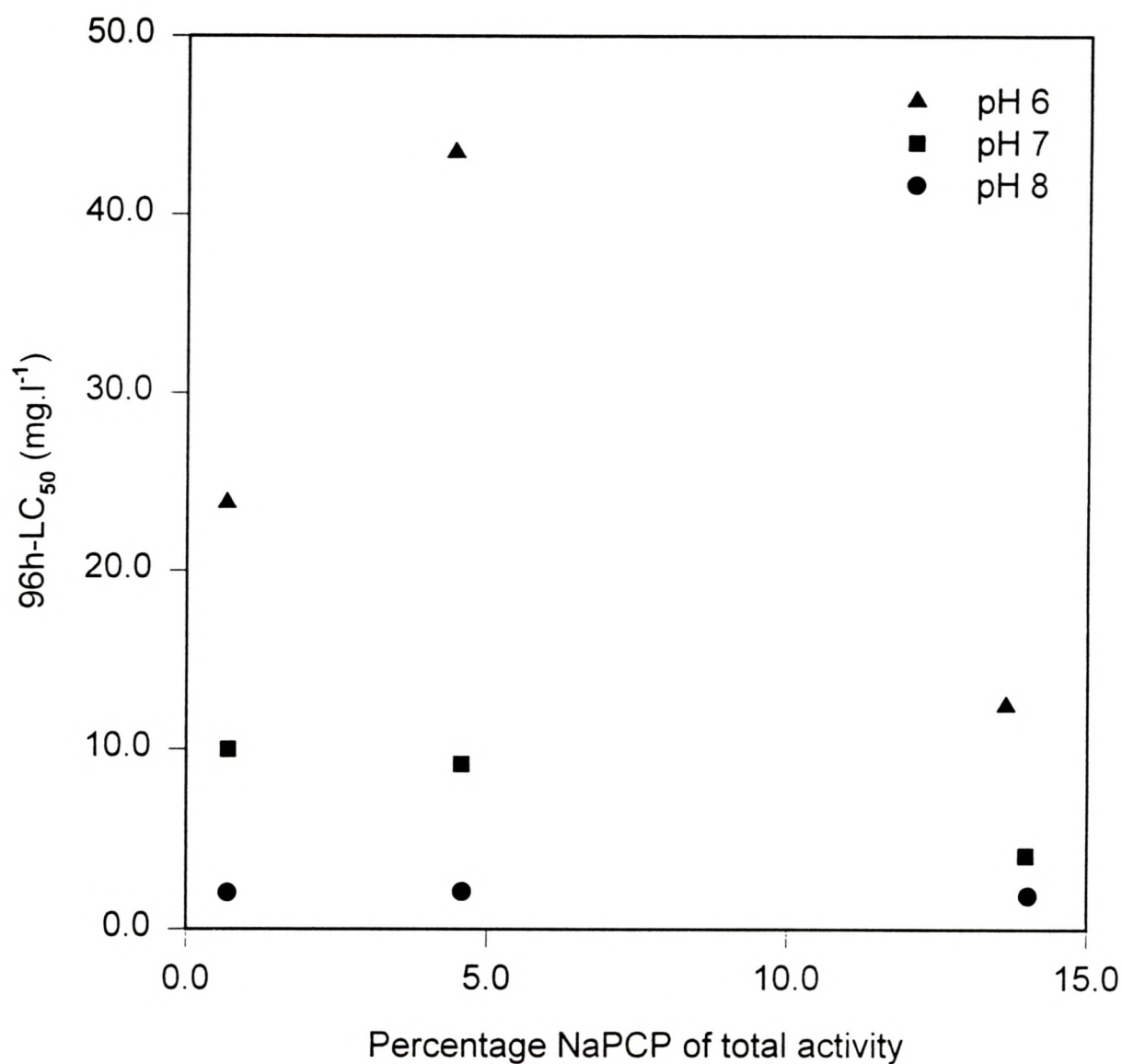
Figuur 15. Verband tussen de 96h-LC₅₀ waarden en de activiteit van het ongedissocieerde pentachlorofenol

96hLC₅₀- PCP⁻ relationship



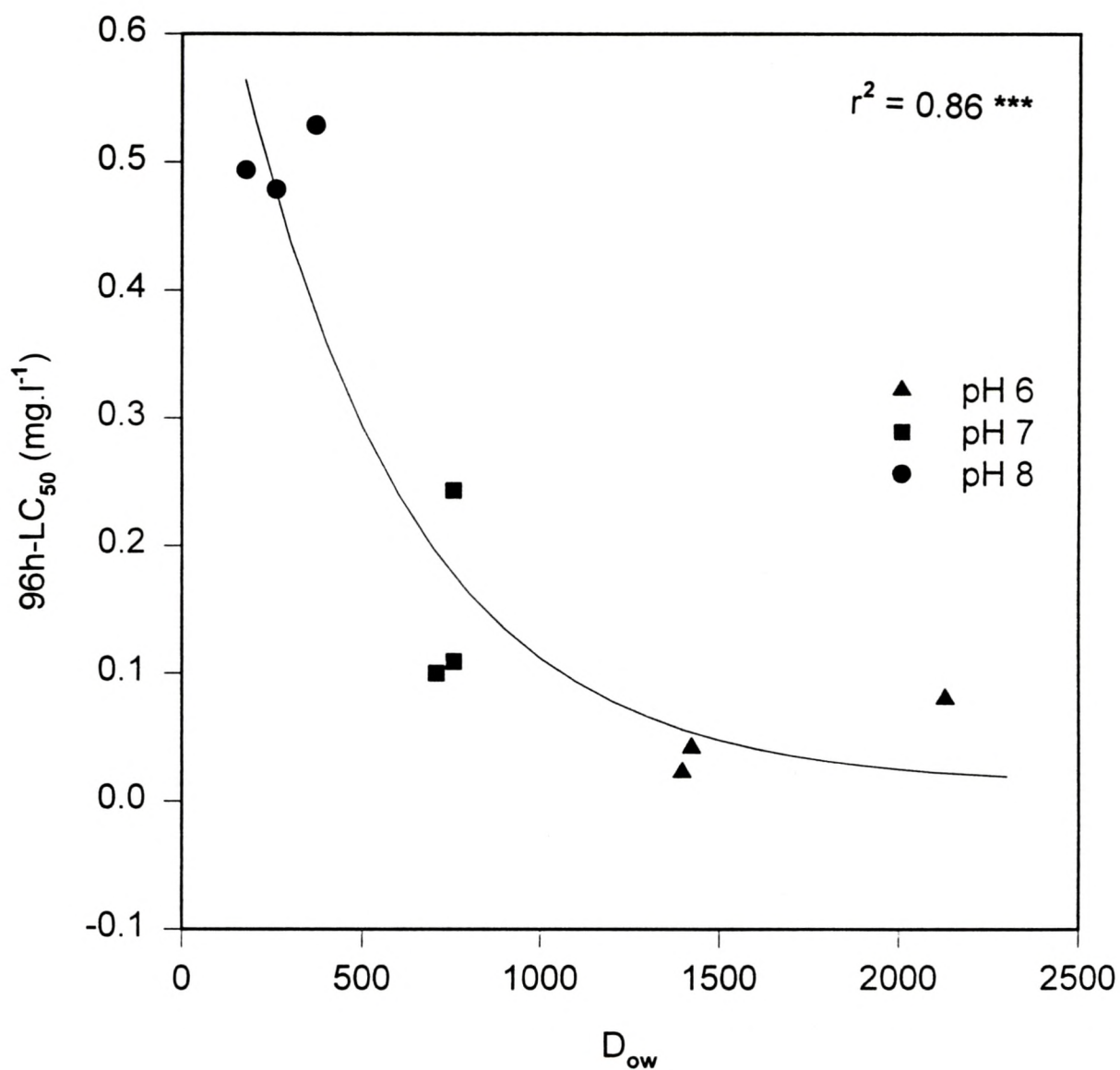
Figuur 16. Verband tussen de 96h-LC₅₀ waarden en de activiteit van het gedissocieerde pentachlorofenolaat

96hLC₅₀ - NaPCP relationship



Figuur 17. Verband tussen de 96h-LC₅₀ waarden en de activiteit van het natriumpenta-chlorofenolaatcomplex

96hLC₅₀-D_{ow} relationship for pentachlorophenol

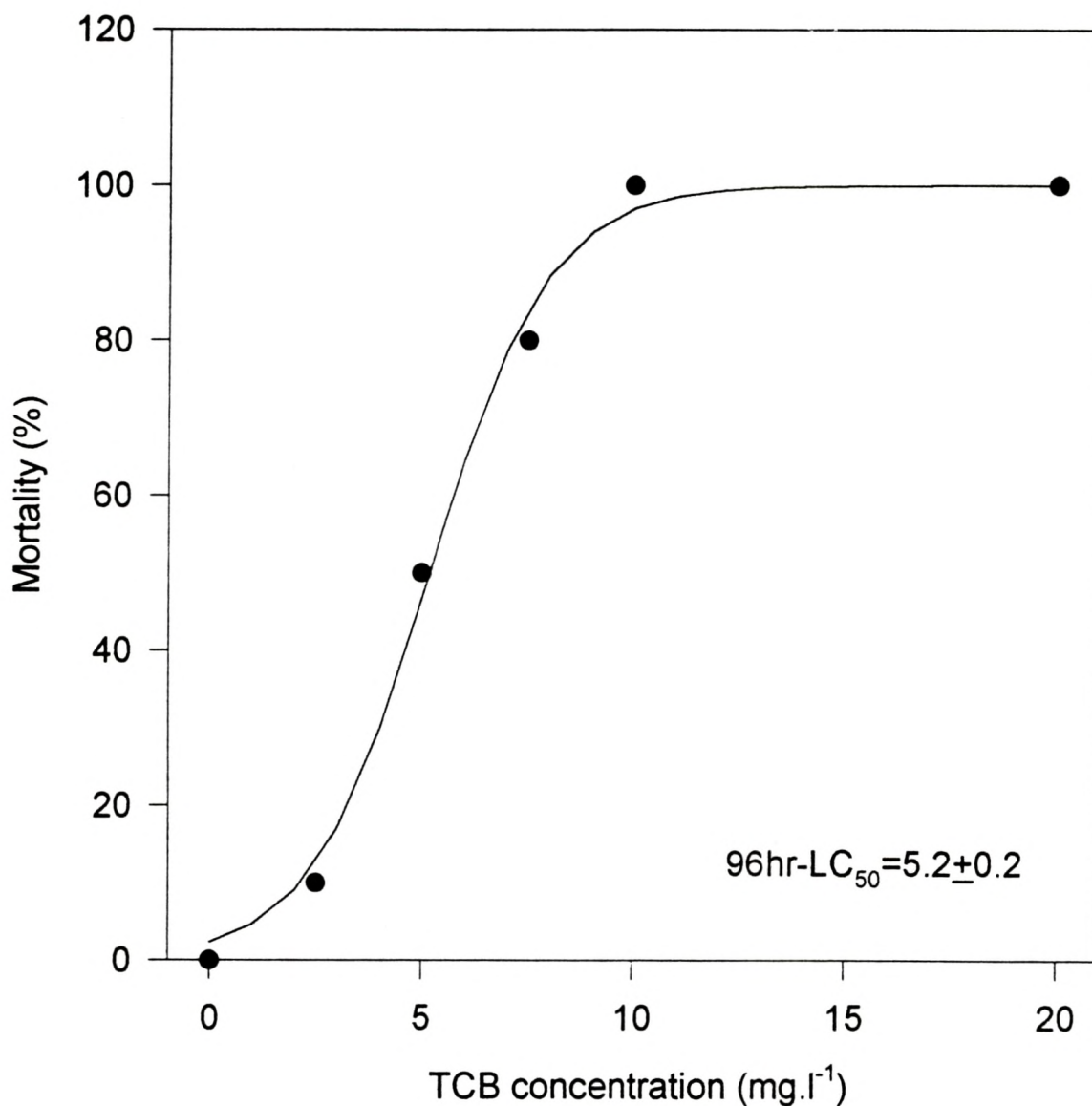


Figuur 18. Verband tussen de 96h-LC₅₀ waarden en de D_{ow} voor pentachlorofenol

Ook voor *1,2,4-trichlorobenzene*, aangekocht bij SUPELCO (99%), werd een stockoplossing aangemaakt in ethanol p.a. van 0.5 g .ml⁻¹. Het concentratiebereik lag daar tussen 2500 en 45000 µg.l⁻¹. De toxiciteitsbepalingen werden voor 1,2,4-trichlorobenzene uitgevoerd bij pH 8, saliniteit 30 g.l⁻¹; bij pH 7, saliniteit 10 g.l⁻¹ en bij pH 6, saliniteit 1 g.l⁻¹. Net zoals de K_{ow} geven ook de toxiciteitstesten allemaal zeer gelijkaardige resultaten voor de verschillende experimentele condities. Men bekomt een 96h-LC₅₀ waarde van 5.2 ± 0.2 mg.l⁻¹. Een effect van de zuurtegraad of de pH kon niet aangetoond worden. De resultaten van de experimenten zijn weergegeven in Figuur 19 en 20.

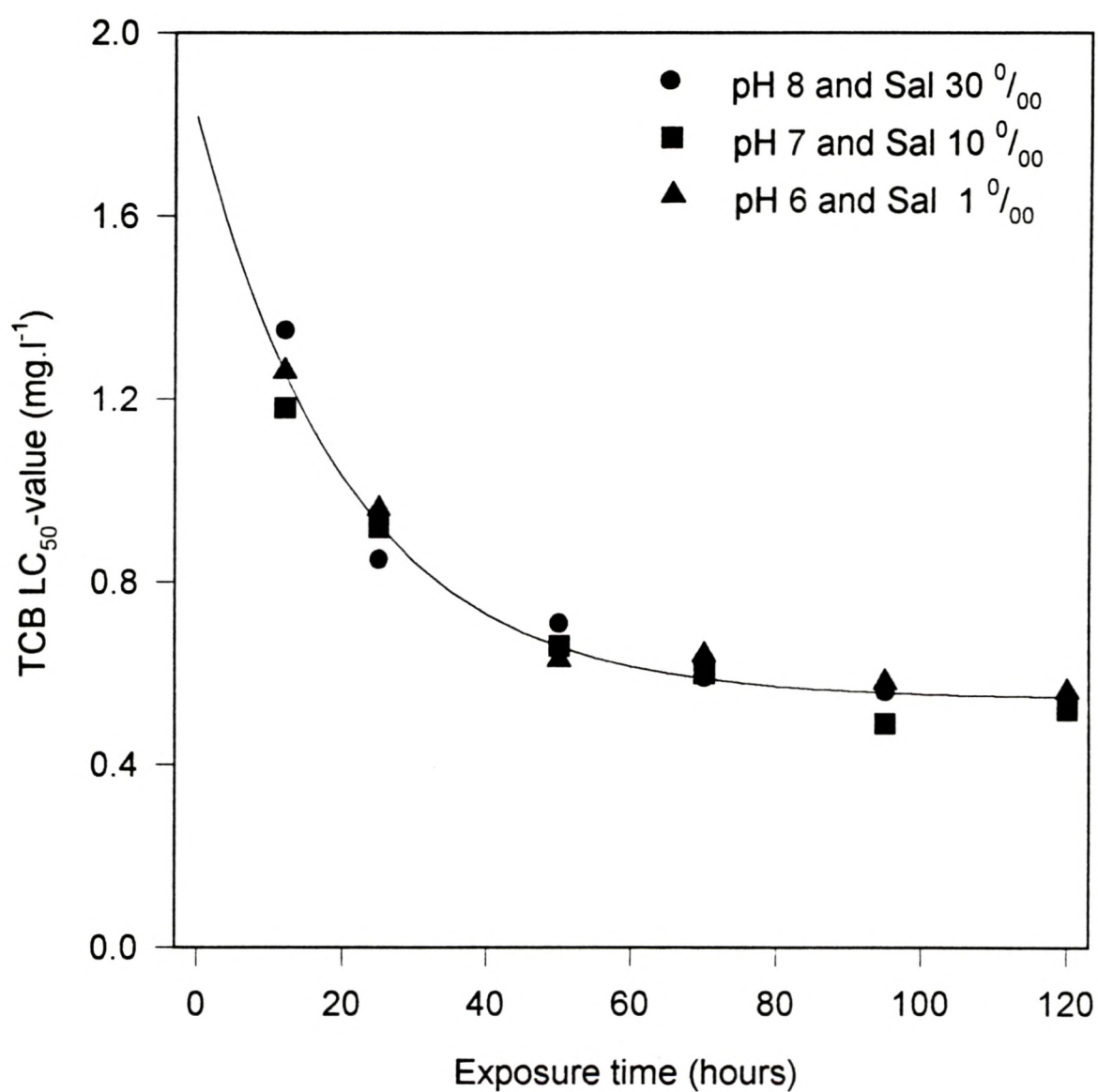
Diquat is in de handel echter enkel verkrijgbaar onder geformuleerde vorm en daarom onder die vorm niet geschikt om 96h-LC₅₀ waarden te bepalen. Om diquat onder zuivere vorm te verkrijgen dient een aanvraag ingediend te worden bij ZENECA.

Mortality of sheepshead minnow after 96 hr exposure to TCB
(pH=8.0, Sal=30⁰/00, T=25 °C)



Figuur 19. Mortaliteit van sheepshead minnow na 96h blootstelling aan 1,2,4-trichlorobenzeen (TCB)

Effect of exposure time on sheepshead minnow LC_{50} for TCI



Figuur 20. Effect van de blootstellingstijd op de LC_{50} voor 1,2,4-trichlorobenzeen

6. ACCUMULATIE EN KRITISCHE LICHAAMSRESIDUES IN FUNCTIE VAN OMGEVINGSOMSTANDIGHEDEN

6.1. Opname en toxiciteit

Daar de opname verschillend kan zijn voor de verschillende vormen waaronder een dissocieerbare verbinding voorkomt, zal deze evenals de speciatie en de distributieverhouding afhangen van pH en saliniteit. Doorgaans wordt gesteld dat de lipofiele niet-geïoniseerde organische polluenten toxischer zijn dan de geïoniseerde omdat deze gemakkelijker door de celmembraan kunnen penetreren (en dus gemakkelijker worden opgenomen). Er wordt met andere woorden vanuit gegaan dat de opname van de geïoniseerde vorm verwaarloosbaar is en dat de absorptiesnelheid van ioniseerbare componenten direct proportioneel is met de concentratie van de niet-geïoniseerde vorm. Men spreekt in dit verband van de *pH-partitie-hypothese* (Shore et al., 1957; Hogben et al., 1959; Jollow en Brodie, 1972).

Daardoor zal voor dissocieerbare componenten *de zuurtegraad* een cruciale rol spelen bij de opname. Afhankelijk van de pK_a van de component en de pH van het medium zal de speciërende verbinding in min of meerdere mate voorkomen onder de gedissocieerde vorm en afhankelijk daarvan beter of minder goed opgenomen worden. De pH-partitie-hypothese lijkt te worden bevestigd door verscheidene auteurs die een daling van de acute en chronische toxiciteit (LC_{50}) waarnamen bij stijgende pH voor zwak zure fenolische componenten (Holcombe, 1980 ; Neilson et al., 1990; Howe et al., 1994).

Andere studies hebben aangetoond dat de waargenomen snelheden van opname groter zijn dan men zou verwachten op basis van de pH-partitie-hypothese. Saarikoski et al. (1986) toonden aan dat, wanneer de membraanpermeabiliteit voor gedissocieerde zuren zoals fenolen en carboxylzuren (negatief geladen) verwaarloosbaar wordt ondersteld, de experimenteel waargenomen opnamesnelheden hoger zijn dan deze voorspeld aan de hand van de pH-partitie-hypothese. Op basis van deze hypothese werd voorspeld dat bij een pH twee grootte-orden groter dan de pK_a , de opname twee grootte-orden lager zou zijn dan bij $pH < pK_a$, maar de experimentele opnamesnelheidsconstanten bleken allemaal hoger te zijn. Pärt (1990) vond eveneens dat de gemeten opname van gehalogeneerde fenolen bij pH 9 ongeveer 3-10

keer hoger is dan voorspeld op basis van de dissociatie. Deze resultaten wijzen erop dat de geïoniseerde vorm eveneens opgenomen wordt en bijdraagt tot de gemeten absorptiesnelheid. Vergelijkbare resultaten werden bekomen voor organotin verbindingen door Tas (1993), die de opname bestudeerde van tributyltin bij geacclimatiseerde *Poecilia reticulata*. Tas vond een opnamesnelheidsconstante (k_1) van 140 ± 20 ml/g.d bij $\text{pH} > 7$ voor het neutrale triorganotin hydroxide. Voor een $\text{pH} < 7$ vond Tas een gereduceerde, doch een significante opname van het triorganotin cation ($k_1 = 20 \pm 11$ ml/g.d). Tsuda et al. (1990a) bestudeerde eveneens de bioaccumulatie van tributyltin (TBT) en trifenylnin (TFT) in functie van de pH. Karpers (*Cyprinus carpio* L.) werden gedurende 14 dagen blootgesteld aan concentraties tussen 1 en $2 \mu\text{g.l}^{-1}$. Voor TBT werden opnamesnelheidsconstanten van 160, 220 en 290 ml/g.d bij pH 6, 6.8 en 7.8. Voor TFT werden waarden van 50, 65 en 95 ml/g.d gemeten. Ook andere studies, welke niet de invloed van de pH op de opname tot onderwerp hebben, tonen aan dat de cationische vorm eveneens wordt opgenomen. Versteeg en Shorter (1992) bestudeerden de opname en toxiciteit van dialkyl methyl ammonium chloriden en monoalkyl dimethyl ammonium chloriden bij *Pimephales promelas*. Ondanks de ionische vorm van de quaternaire ammoniumcomponenten werden opnamesnelheidsconstanten van 1.1 tot 235 ml/g/d genoteerd. Het is dus waarschijnlijk dat ook de gedissocieerde vorm bijdraagt tot de opnamekinetiek. Of de gedissocieerde vorm ook effectief wordt opgenomen onder de ionische vorm, of deze wordt gebufferd in de interlaminaire waterlaag ter hoogte van de kieuwen is vooralsnog niet duidelijk (Tas, 1993).

De invloed van de saliniteit op de opname wordt minder goed begrepen. De saliniteit zal eveneens de verschijningsvorm van ioniseerbare verbindingen beïnvloeden. Bij een hoge pH en een hoge ionenconcentratie zullen ioniseerbare verbindingen met een zuur karakter in belangrijke mate onder de zoutvorm voorkomen. Esser en Moser (1982) suggereerden dat de vorming van ionenparen tussen bijvoorbeeld anionische zuren en cationen in oplossing de opname kunnen vergemakkelijken. Volgens deze hypothese zal de toxiciteit van een zure ioniseerbare component maximaal zijn en nagenoeg onafhankelijk van de saliniteit en pH lager dan zijn pK_a van de component. Bij een hoge saliniteit en pH hoger dan de pK_a , zal de toxiciteit voor een zure pollutant intermediair zijn. Dit is in overeenstemming met een stijging in D_{ow} die men waarneemt bij stijgende saliniteit. De toxiciteit zal dan het laagst zijn bij hoge pH en lage saliniteit. Bij een basische organische pollutant mag men het omgekeerde

verwachten. De vooropgestelde hypothese kon echter niet in alle gevallen worden bevestigd door de opnamestudies. Pärt (1989), die opnamesnelheden mat aan de hand van geperfuseerde kieuwpreparaten van *Salmo gairdneri*, vond dat de pH-partitie versus opnamekurven dezelfde waren voor zoutwater vissen als voor deze in zoetwater. Ook Tas (1993) vond voor trifenyltin en tributyltin geen verschillende opnamesnelheidsconstante voor zout en zoet water. Tsuda et al. (1990b) stelden aan zee en zoet water geacclimatiseerde guppies (*Lesbites reticulans*) gedurende 14 dagen bloot aan tributyltin (TBT) en trifenyltin (TFT) bij concentraties van respectievelijk 0.54 en 0.9 $\mu\text{g.l}^{-1}$ in zoet en aan concentraties van 0.28 en 0.22 $\mu\text{g.l}^{-1}$ in zout water. De opnamesnelheidsconstanten voor TBT voor zoet en zee water waren 70 en 35 ml/g.d, respectievelijk, een factor twee verschil dus.

Bij de studie van de opname als functie van de pH en de saliniteit mag niet uit het oog worden verloren dat de omgevingsfactoren ook de fysiologie van de testorganismen (bijvoorbeeld de morfologie van de kieuwmembranen) kunnen beïnvloeden. Bij de interpretatie van de opname experimenten zal hiermee rekening gehouden moeten worden. In wat volgt worden eerst de opnameproeven besproken. Vervolgens worden de resultaten geïnterpreteerd aan de hand van lineair één-compartimentmodel

6.2. Opnameproeven met *Cyprinodon variegatus*

De acclimatisatie voor de opname-experimenten gebeurt op analoge wijze als voor de acute toxiciteitsmetingen. Voor de opname-experimenten wordt gewerkt met ^{14}C -gemerkte producten wat een eenvoudige bepaling van de concentraties in de testorganismen moet mogelijk maken. ^{14}C -gelabelde pentachlorofenol en 1,2,4-trichlorobenzeen werden aangekocht bij Sigma, diquat bij Amersham. De periode van blootstelling varieert van 2 tot 120 h. Daar er gewerkt wordt met een statisch systeem worden zowel het water als de vissen op regelmatige tijdstippen bemonsterd.

Het werken met ^{14}C laat enkel toe de totale concentratie aan contaminant te bepalen en er kan dus geen onderscheid gemaakt worden tussen de verschillende aanwezige speciërende vormen. Eerdere studies hebben aangetoond dat metabolisatie van de chemische stoffen in muggenlarven *Chironomus riparius* in de gebruikte tijdspanne niet voorkomt (Lydy et al.,

1990). Bij goudvis (*Carassius auratus*) daarentegen bleek dat pentachlorofenol wel gemetaboliseerd werd gedurende de beschouwde tijdspanne (Stehly en Hayton, 1990). Het is niet uit te sluiten dat de opname beïnvloed wordt door de gebruikte buffers, maar men kan aannemen dat de veranderingen klein zijn in vergelijking met het effect van de pH op de opname (Stehly en Hayton, 1990). De accumulatie in functie van de zuurtegraad en saliniteit werd bepaald door dieren in een statisch systeem in groepen van 49 gedurende 120h bloot te stellen aan een bepaalde concentratie pentachlorofenol. De proeven werden uitgevoerd in 10 l aquaria, waar 8 l water was toegevoegd voor pentachlorofenol en 2 l water voor 1,2,4-trichlorobenzeen en diquat. Het totale versgewicht van de vissen in de aquaria was steeds lager dan 1 g.l⁻¹. De zuurtegraad, de concentratie opgeloste zuurstof en de saliniteit werden constant gehouden tijdens de uitvoering van het experiment. Na een bepaalde opnameperiode (3, 6, 12, 26, 50, 74 en 105 h) worden 7 vissen uit het testmedium gehaald en gedurende ongeveer 5 minuten in 0.5 l niet-radioactief gemerkt testmedium gespoeld. Hierdoor wordt de hoeveelheid radionucliden die aan de externe oppervlakken van de dieren kleven, verwijderd. De vissen worden in een transparant glazen recipiënt gebracht, waar 1 ml weefseloplosser (Solueen, Canberra Packard) in aanwezig is en vervolgens gewogen. Vervolgens worden ze gedurende 24h geschud om het oplossen van de weefsels te bevorderen. Een scintillatievloeistof (10 ml Hionic, Packard) wordt toegevoegd aan de monsters, waarna de totale radioactiviteit (β -stralen) wordt bepaald. Ook worden er op tijdstip $t=0$, 3, 6, 12, 26, 50, 70 en 105 h in 3 replicaten waterstalen (1 ml) genomen en geteld na toevoeging van 10 ml ULTIMA GOLD XR (Canberra Packard) en 24h schudden. De sample counts werden vervolgens gecorrigeerd voor background en quench.

6.3. Analyse van de resultaten aan de hand van een lineair één-compartimentmodel en bepalen van de kritische lichaamsresidues

De bioconcentratie van chemische stoffen in aquatische organismen wordt gekarakteriseerd door de bioconcentratiefactor BCF. De bioconcentratiefactor is de verhouding van de concentratie van de verbinding in het organisme tot de concentratie in het water bij evenwicht. Nochtans is het niet altijd mogelijk om de evenwichtsconcentraties te bepalen, wanneer de tijd om evenwicht te bereiken lang is of wanneer de chemische stof niet stabiel is. Een alternatieve benadering is het gebruik van een kinetisch model om de

evenwichtsconcentraties te schatten aan de hand van de accumulatiekinetiek (Branson et al., 1975; Hayton en Barron, 1990).

De resultaten van de opname-experimenten kunnen geïnterpreteerd worden aan de hand van een lineair één compartimentmodel (van Straalen, 1991). Hierin wordt de vis beschouwd als één compartiment, waarin de organische stoffen zich gelijkmatig verdelen. Er wordt verondersteld dat de opnamesnelheid constant is en de eliminatiesnelheid recht evenredig is met de hoeveelheid in het organisme. Beschouwt men de door de vis opgenomen hoeveelheid als verwaarloosbaar klein ten opzichte van de hoeveelheid in de aquaria aanwezig met andere woorden, veronderstelt men dat de concentratie in het water min of meer constant blijft, dan kan de concentratie in de vis berekenend worden met behulp van volgende uitdrukking:

$$C_f = C_w \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 \cdot t})$$

met C_f = de concentratie aanwezig in de vis op tijdstip t ($\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$);

C_w = de concentratie aanwezig in het water ($\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$);

k_1 = opnamesnelheidsconstante (h^{-1});

k_2 = eliminatiesnelheidsconstante (h^{-1});

t = tijd (h).

De bioconcentratiefactor BCF wordt bij gedefinieerd als:

$$BCF = \frac{k_1}{k_2}$$

en is bij evenwicht gelijk aan:

$$BCF = \frac{C_f}{C_w}$$

Aan de hand van de opnameconstante, de eliminatieconstante en de LC_{50} waarden en daar de dichtheid van de vissen gekend is (ongeveer $1.0 \text{ kg} \cdot \text{l}^{-1}$), kunnen de kritische lichaamsresidues berekend worden. De kritische lichaamsresidues CBR geven aan of de beschouwde component onder de verschillende omstandigheden even toxisch is en worden gegeven door:

$$CBR = LC_{50} \cdot \frac{k_1}{k_2} \cdot (1 - e^{-k_2 t})$$

met CBR = kritisch lichaamsresidue (mg.kg⁻¹);

LC₅₀ = concentratie waarbij 50% van de populatie sterft (mg.l⁻¹);

k₁ = opnamesnelheidsconstante (h⁻¹);

k₂ = eliminatiesnelheidsconstante (h⁻¹);

t = tijd (h).

De kritische interne concentratie hypothese (Connell en Markwell, 1992) suggereert dat een toxisch effect voorkomt als de accumulatie de waarde overschrijdt waar het kritisch niveau van de component is bereikt in het beschouwde orgaan.

De accumulatie-experimenten voor *pentachlorofenol* werden uitgevoerd bij 25°C, bij pH 6, 7 en 8 en saliniteit 1, 10 en 30 g.l⁻¹, de buffercapaciteit bedroeg 10 mM. De concentratie pentachlorofenol werd 10 maal lager gekozen dan de 96h-LC₅₀ waarde, dus bij 2 µg.l⁻¹ bij pH 6, bij 10 µg.l⁻¹ bij pH 7 en bij 50 µg.l⁻¹ bij pH 8. De concentratie pentachlorofenol in het water daalde met ongeveer 10%, voornamelijk te wijten aan wandadsorptie. De condities waarbij de experimenten werden uitgevoerd waren Het effect van de blootstellingstijd en de blootstellingscondities op de accumulatiekinetiek is weergegeven in Figuur 21 tot 23. Accumulatie door de vissen gebeurt snel en bereikt een evenwichtsniveau na ongeveer 48 h. De accumulatie van pentachlorofenol neemt sterk af met dalende zuurtegraad (stijgende pH) voor de verschillende saliniteiten. De accumulatie is bij de drie zuurtegraden steeds het laagst bij een saliniteit van 30 g.l⁻¹. Bij saliniteiten 1 en 10 g.l⁻¹ is de situatie minder éénduidig. Bij pH 8 en 6 accumuleert pentachlorofenol sterker bij 1 g.l⁻¹ dan bij 10 g.l⁻¹, maar bij pH 7 is er weinig verschil. Dit houdt in dat er niet steeds een éénduidig verband bestaat tussen de waargenomen toxiciteit en de accumulatiekinetiek onder de verschillende experimentele omstandigheden.

Daar zowel de concentratie in het water als de concentratie in de vis voor de verschillende tijdstippen werd gemeten, kunnen de opnamesnelheidsconstante en de eliminatieconstante met behulp van niet lineaire schattingsmethoden met STATISTICA (StatSoft Inc., Tulsa) geschat

worden. De parameterschattingen van k_1 , k_2 voor het lineair één-compartimentmodel en de daaruit berekende BCF zijn weergegeven in Tabel 4. Met behulp van de T'-methode werden 99% vergelijkingsintervallen berekend voor k_1 en k_2 voor de verschillende condities. Daaruit bleek dat de opnamesnelheidsconstante significant ($0.01 \geq p > 0.001$) verschillend was voor alle condities, dit in tegenstelling tot de eliminatieconstante. De opnameconstante verandert dus veel sterker met de omgevingsomstandigheden dan de eliminatieconstante. Dit betekent dat veranderingen in de accumulatiekinetiek voornamelijk het gevolg zijn van effecten ter hoogte van de opnameplaats, waarbij de chemische speciatie de voornaamste factor is, en veel minder ter hoogte van de eliminatieplaats. Daar sheepshead minnow bovendien gedurende lange tijd kunnen leven bij pH 6, zijn ze waarschijnlijk in staat om de pH van hun bloed constant te houden binnen nauwe grenzen (Dively et al., 1977). Het is daarom onwaarschijnlijk dat veranderingen in de pH van het water de distributie, de intrinsieke activiteit, of het metabolisme van fenolen in de vis in belangrijke mate beïnvloeden (Saarikoski en Viluksela, 1981). Daarenboven worden fenolen voornamelijk als neutrale

Tabel 4. Waarden en standaard errors voor k_1 , k_2 (h^{-1}) en de BCF voor de verschillende condities voor pentachlorofenol

		pH 6	pH 7	pH 8
Sal = 1 g.l ⁻¹	k_1	176.0 ± 35.5	65.0 ± 1.80	18.3 ± 4.1
	k_2	0.083 ± 0.021	0.100 ± 0.032	0.085 ± 0.02
	BCF	2120	650	212
Sal = 10 g.l ⁻¹	k_1	84.0 ± 22.1	33.27 ± 3.775	8.87 ± 1.00
	k_2	0.060 ± 0.019	0.046 ± 0.06	0.048 ± 0.007
	BCF	1400	724	185
Sal = 30 g.l ⁻¹	k_1	77.9 ± 11.5	40.3 ± 4.56	5.59 ± 0.57
	k_2	0.079 ± 0.014	0.108 ± 0.014	0.126 ± 0.014
	BCF	986	373	44

verbindingen door vis geëxcreteerd (Kobayashi, 1978), waardoor verwacht wordt dat de eliminatie nagenoeg onafhankelijk is van de pH van het water. Zowel de opnamesnelheidsconstante (k_1), als de BCF dalen met stijgende saliniteit voor de verschillende pH's. Alleen bij pH 7 is de daling van de BCF met stijgende saliniteit niet zo duidelijk. Gelijkaardige resultaten werden bekomen door Tachikawa et al. (1991) die een BCF voor zee water geacclimatiseerde *Oryzias latipes* vond van 371 ± 31 en een k_1 van $8.5 \pm 0.8 \text{ h}^{-1}$. Voor zoet water geacclimatiseerde vissen vond hij een BCF van 1684 ± 274 en een k_1 van $18.0 \pm 0.6 \text{ h}^{-1}$. De pH van het zoet water was tussen 6.1 en 7.7 en voor zee water tussen 6.3 en 7.8. Kishino en Kobayashi (1995) vonden een BCF voor goudvis voor zoet water bij 20°C bij pH 6 van 584, bij pH 8 118 en bij pH 10 8.9. Trujillo et al. (1972) suggereerden dat de lagere pentachlorofenol accumulatie in mariene vissen mogelijk is doordat het relevant enzym systeem in mariene vissen vlugger reageert (bv. een vlugge inductie van het enzym) dan dat van zoet water vissen.

De accumulatiekinetiek is sterk afhankelijk van de speciatie van het pentachlorofenol (zie ook Figuur 24 tot 26). De opnamesnelheid k_1 en de bioconcentratiefactor BCF stijgen met stijgende activiteit van het neutrale pentachlorofenol, waarbij de verandering in de activiteit van dit species $69\%^{**}$ ($0.01 \geq p > 0.001$) van de verandering in k_1 en $75\%^{**}$ ($0.01 \geq p > 0.001$) van de variatie in BCF verklaart. De variatie daalt verder wanneer ook nog de activiteit van het gedissocieerde pentachlorofenolaat mee wordt beschouwd. In dat geval verklaart het model $83\%^{**}$ ($0.01 \geq p > 0.001$) van de variatie in k_1 en $89\%^{**}$ ($0.01 \geq p > 0.001$) van de variatie in BCF. Herhaalt men de analyse met de concentratie van het ongedissocieerde pentachlorofenol, dan verklaart het model $72\%^{**}$ ($0.01 \geq p > 0.001$) van de variatie van k_1 en $78\%^{**}$ ($0.01 \geq p > 0.001$) van de variatie van BCF. Houdt men eveneens rekening met de concentratie van het gedissocieerde pentachlorofenolaat, dan kan men $84\%^{**}$ ($0.01 \geq p > 0.001$) van de variatie van k_1 en $91\%^{***}$ ($p \leq 0.001$) van de variatie van BCF verklaren. De variatie daalt niet verder wanneer ook nog andere species, zoals het natriumpentachlorofenolaatcomplex, in de analyse worden betrokken. Dit wijst erop dat de vorming van neutrale zoutcomplexen de opname en accumulatie van pentachlorofenol niet beïnvloedt.

Het verband tussen k_1 en D_{ow} wordt weergegeven in Figuur 27. Daaruit blijkt dat een

significant verband bestaat tussen beide ($r^2 = 0.48^*$ ($0.05 \geq p > 0.01$)). Figuur 28 geeft een eveneens significant verband tussen BCF en D_{ow} weer ($r^2 = 0.53^*$ ($0.05 \geq p > 0.01$)). Hieruit mag besloten worden dat D_{ow} een relatief goede maat is voor de BCF. Hier dient wel opgemerkt te worden dat uit voorgaande resultaten is gebleken dat de gedissocieerde vorm en niet de zoutvorm wordt opgenomen en dat dit bij de D_{ow} net andersom is.

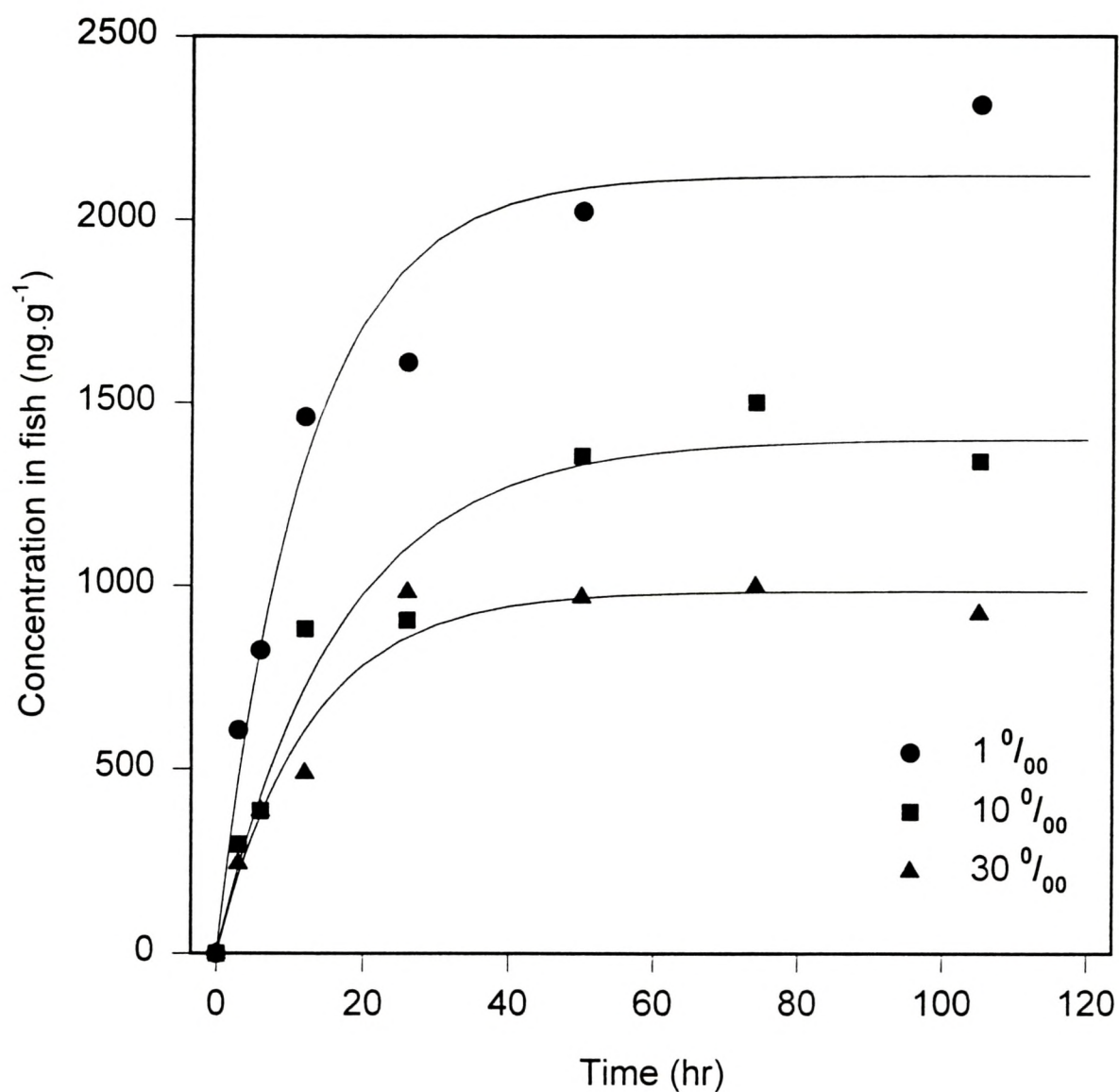
De relatie tussen de 96h- LC_{50} waarden en de BCF voor pentachlorofenol is weergegeven in Figuur 29 ($r^2 = 0.82^{***}$ ($p \leq 0.001$)). Daar uit Fig. 28 blijkt dat er een verband bestaat tussen BCF en D_{ow} alhoewel er voor beide variabelen toch verschillende processen aan de basis liggen, kan men voor 96h LC_{50} - k_1 ($r^2 = 0.89^{***}$ ($p \leq 0.001$)) (Figuur 30) een gelijkaardig verband verwachten als voor 96h LC_{50} - D_{ow} (Figuur 18).

Figuur 31 geeft de op de LC_{50} gebaseerde kritische lichaamsresidues weer voor sheepshead minnow voor pentachlorofenol. Enkel een invloed van de pH kan afgeleid worden bij saliniteit 10 en 30 g.l⁻¹. Onder deze condities is de toxiciteit van pentachlorofenol het hoogst bij pH 6 en het laagst bij pH 8, wat erop kan wijzen dat sheepshead minnow niet goed bestand is tegen een zure pH. Dit kan dan ook een verklaring zijn waarom men een lage regressiecoëfficiënt vindt tussen de 96h- LC_{50} en de speciatie. Er kon geen invloed van de saliniteit aangetoond worden. De kritische lichaamsresidues komen goed overeen met de waarde 79.9 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (McCarty et al., 1992) en 100 $\mu\text{g.g}^{-1}$ voor goudvis (*Carassius auratus*) (Kobayashi en Akitake, 1975; Kishino en Kobayashi, 1995) die men in de literatuur terugvindt. Kobayashi en Akitake (1975) vonden echter wel dat het kritisch lichaamsresidues aan pentachlorofenol nagenoeg onafhankelijk waren van de pH van het water.

Net zoals bij de 96h- LC_{50} en de D_{ow} van 1,2,4-trichlorobenzeen, wordt ook de accumulatie niet beïnvloed door de omgevingsfactoren. Hier werden de accumulatie-experimenten voor alle condities uitgevoerd bij 0.5 mg.l⁻¹. Deze werden uitgevoerd bij 25°C, een buffercapaciteit van 10 mM en bij dezelfde condities als de toxiciteitsmetingen. De resultaten zijn weergegeven in Figuur 32. Men bekomt voor de verschillende condities een k_1 van $1631.2 \pm 126.9 \text{ h}^{-1}$ en een k_2 van $1.88 \pm 0.17 \text{ h}^{-1}$, wat overeenkomt met een BCF van 867. Ook de kritische lichaamsresidues (Figuur 33) blijven gelijk voor de verschillende condities en komen vrij goed overeen met de literatuurwaarde van 907 $\mu\text{g.g}^{-1}$ (McCarty et al., 1992).

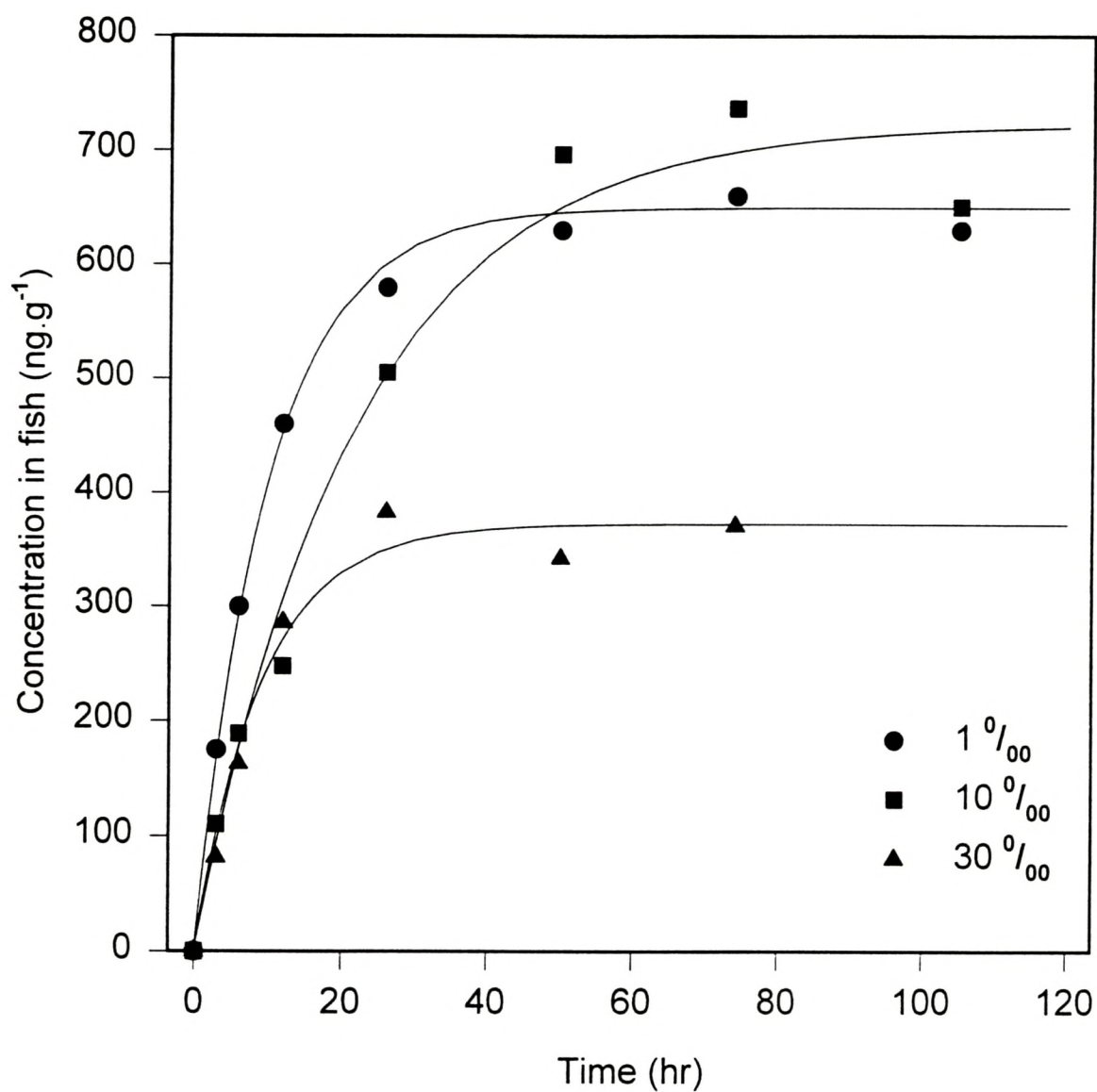
Voor de resultaten van de accumulatie-experimenten van *diquat* wordt verwezen naar Bijlage 1 en 2. Deze werden uitgevoerd bij dezelfde condities als voor pentachlorofenol. Daar er geen gegevens voorhanden waren in verband met de toxiciteit van dit produkt en bovendien op basis van de resultaten van de partitievoëfficiënt verwacht werd dat diquat bijna niet opgenomen zou worden, werd geopteerd om deze experimenten voor alle condities uit te voeren bij een zo hoog mogelijke concentratie en in een zo klein mogelijk volume om toch nog meetbare waarden te bekomen. Hierbij werd echter wel rekening gehouden dat er in een statisch systeem maximaal 1 g vis per liter water aanwezig mag zijn. Een concentratie van $31.6 \mu\text{g.l}^{-1}$ ($10 \mu\text{Ci}$) werd toegevoegd aan 2 l water. De metingen geschieden op analoge wijze als voor pentachlorofenol.

Accumulation of PCP as function of time at pH 6



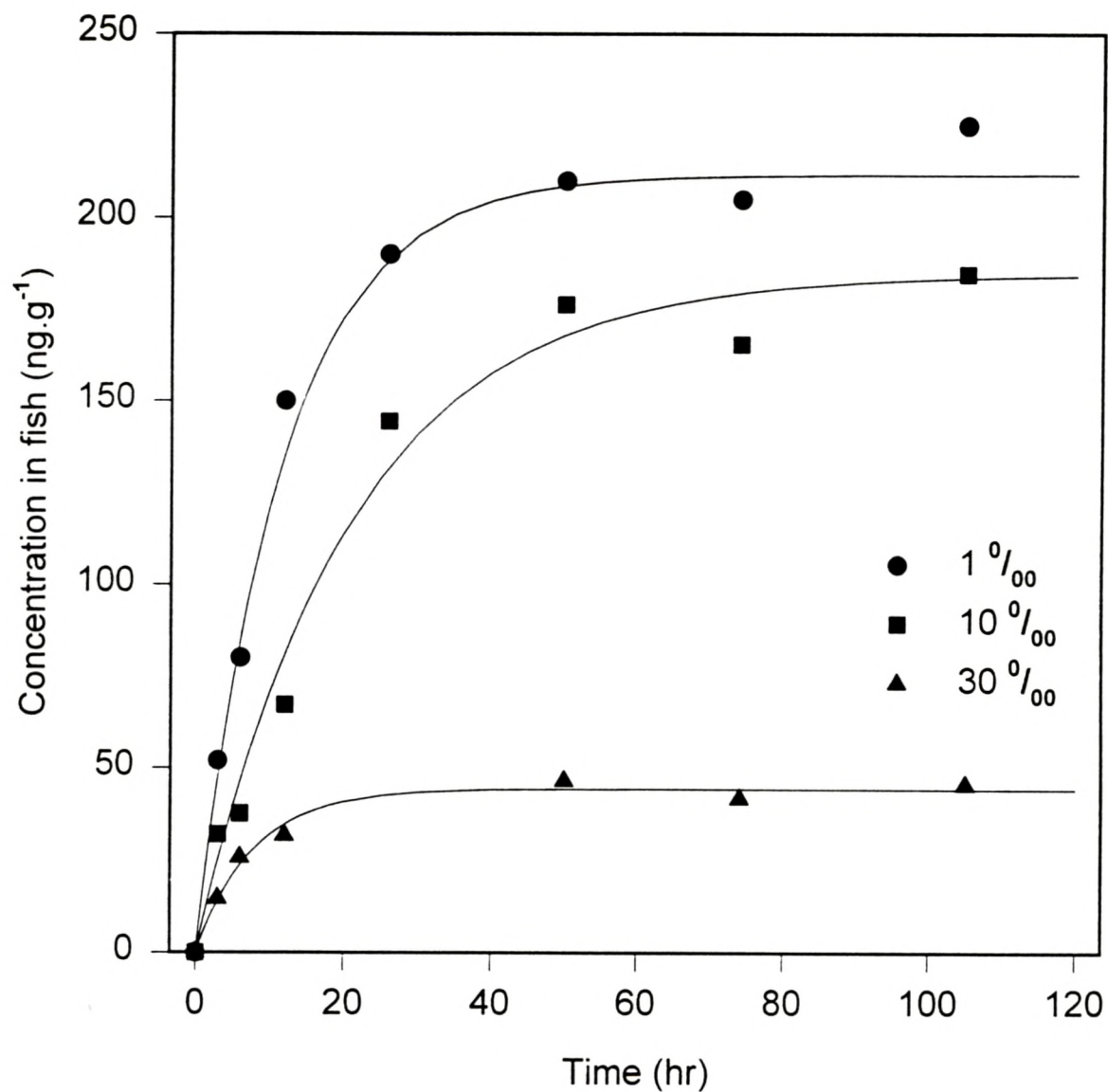
Figuur 21. Accumulatie van pentachlorofenol bij 25 °C in functie van de tijd bij pH 6 bij een blootstellingsconcentratie van 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$

Accumulation of PCP as function of time at pH 7

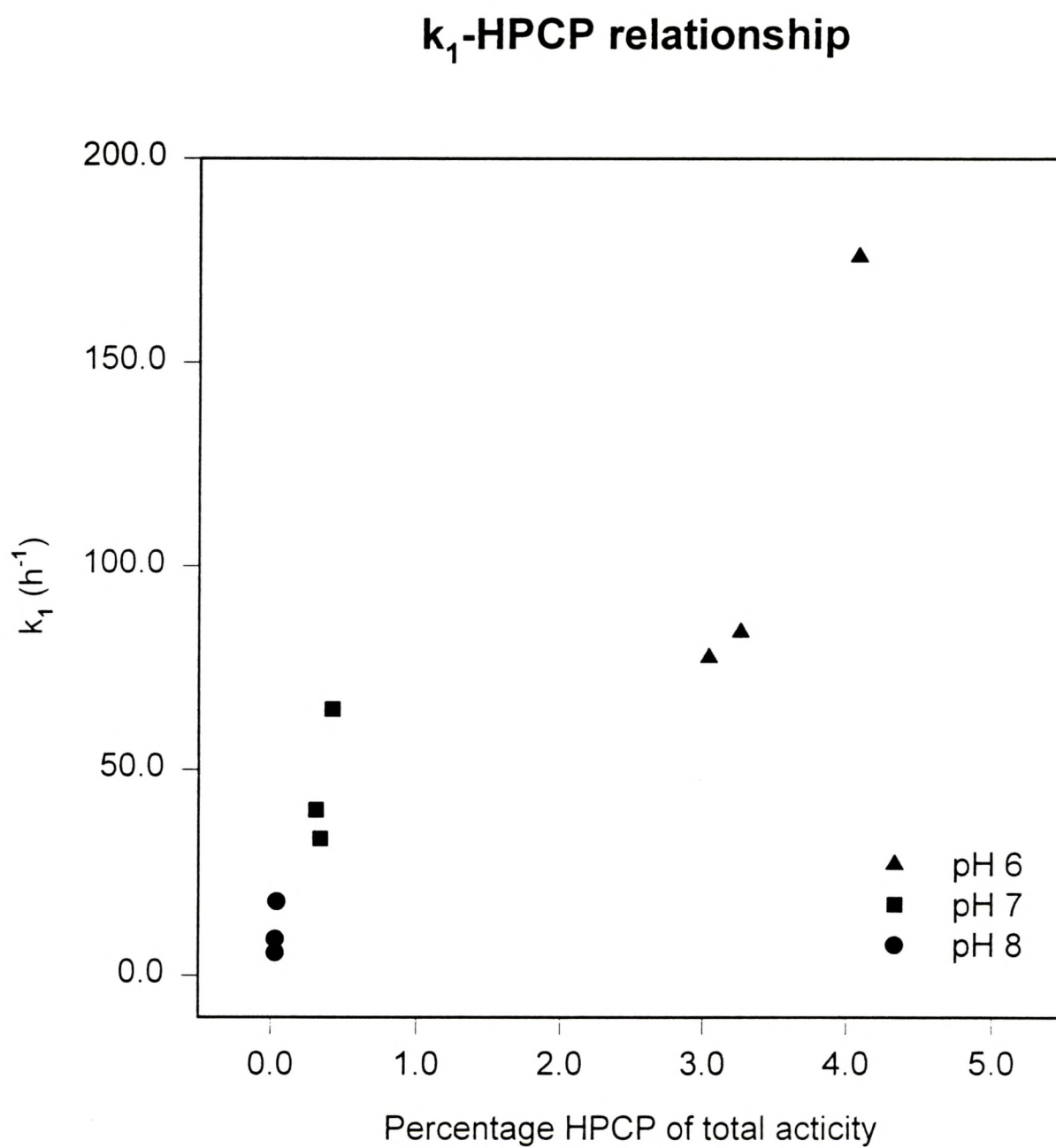


Figuur 22. Accumulatie van pentachlorofenol bij 25 °C in functie van de tijd bij pH 7 bij een blootstellingsconcentratie van $1 \mu\text{g.l}^{-1}$

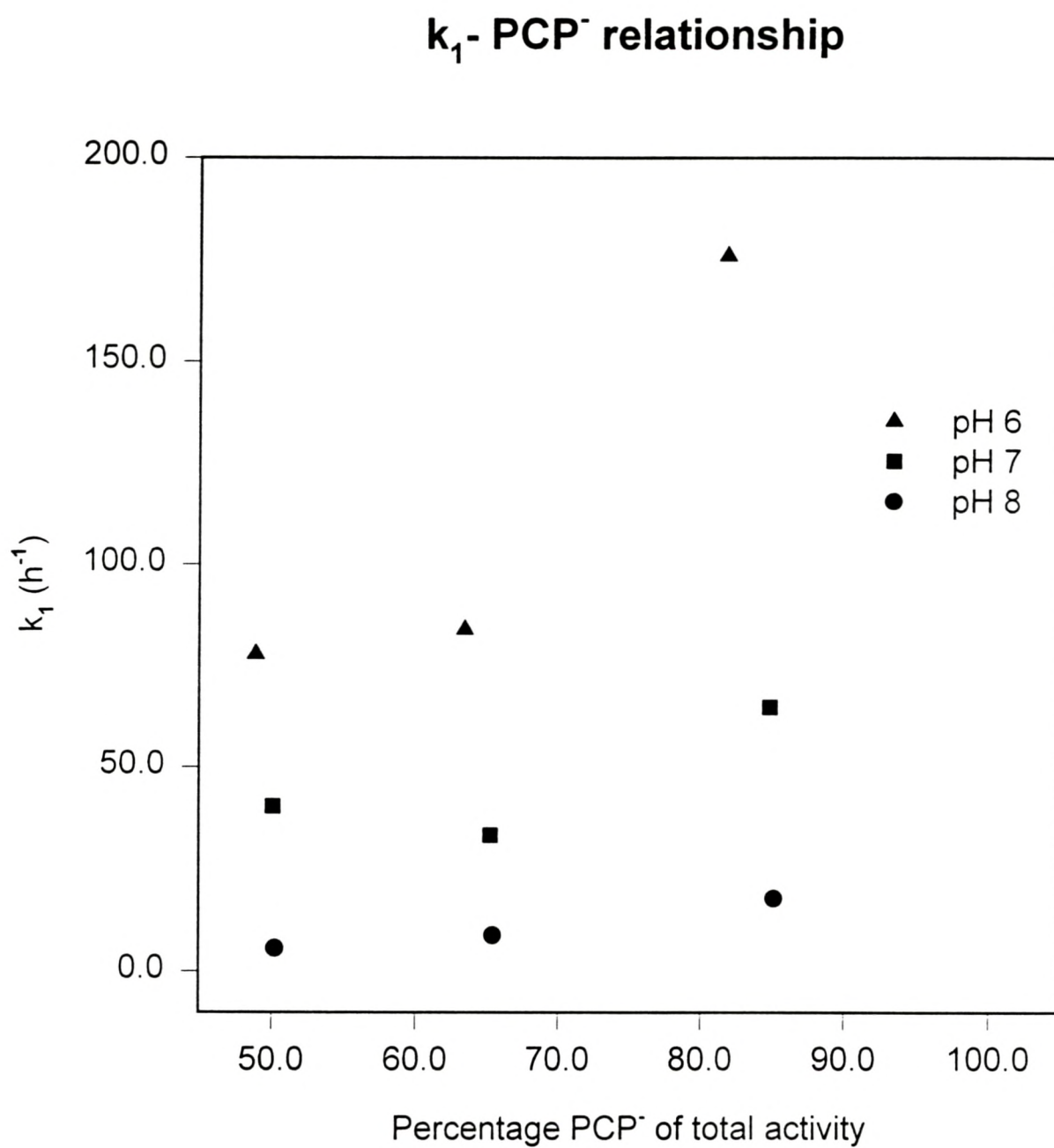
Accumulation of PCP as function of time at pH 8



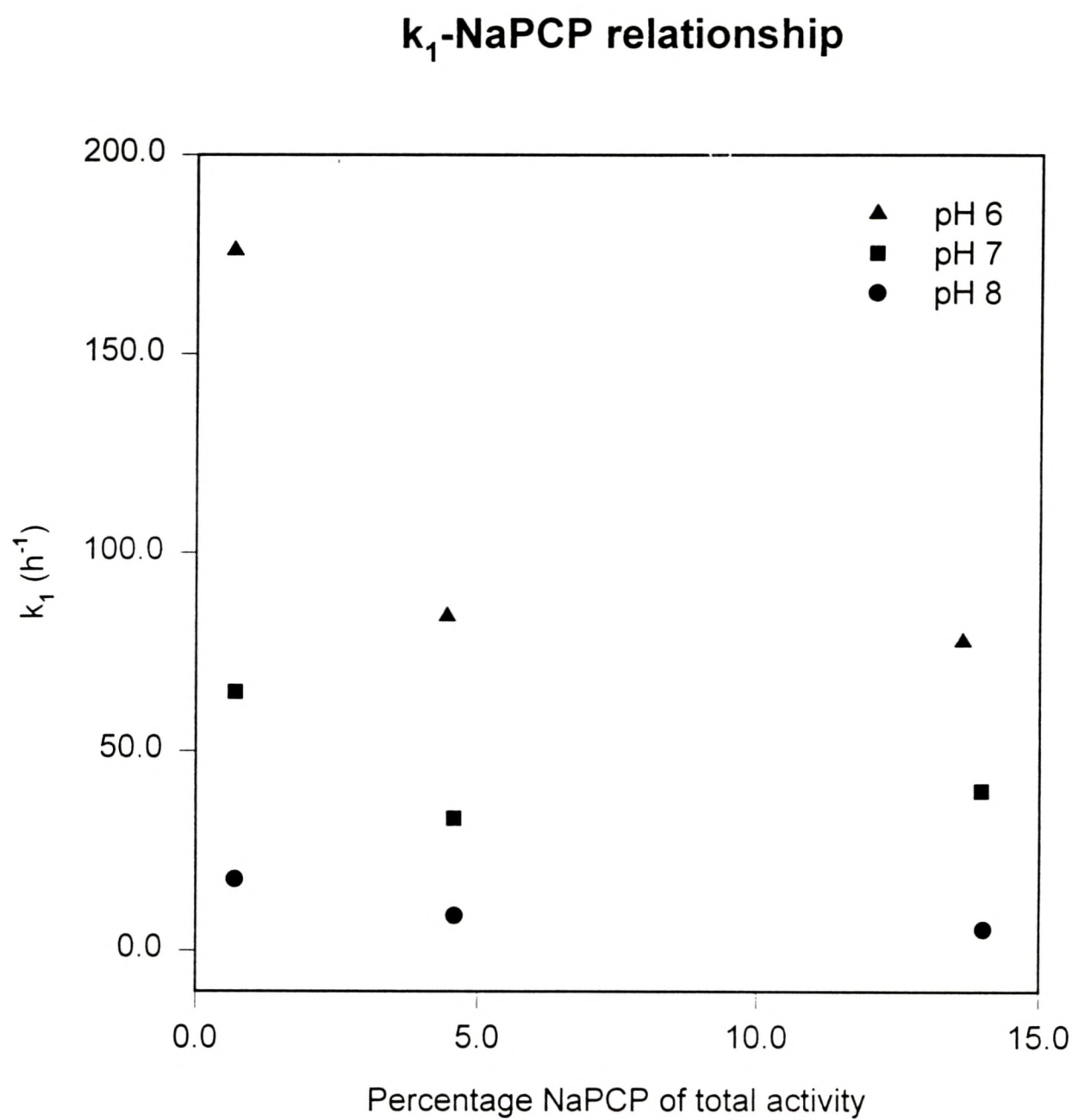
Figuur 23. Accumulatie van pentachlorofenol bij 25 °C in functie van de tijd bij pH 8 bij een blootstellingsconcentratie van 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$



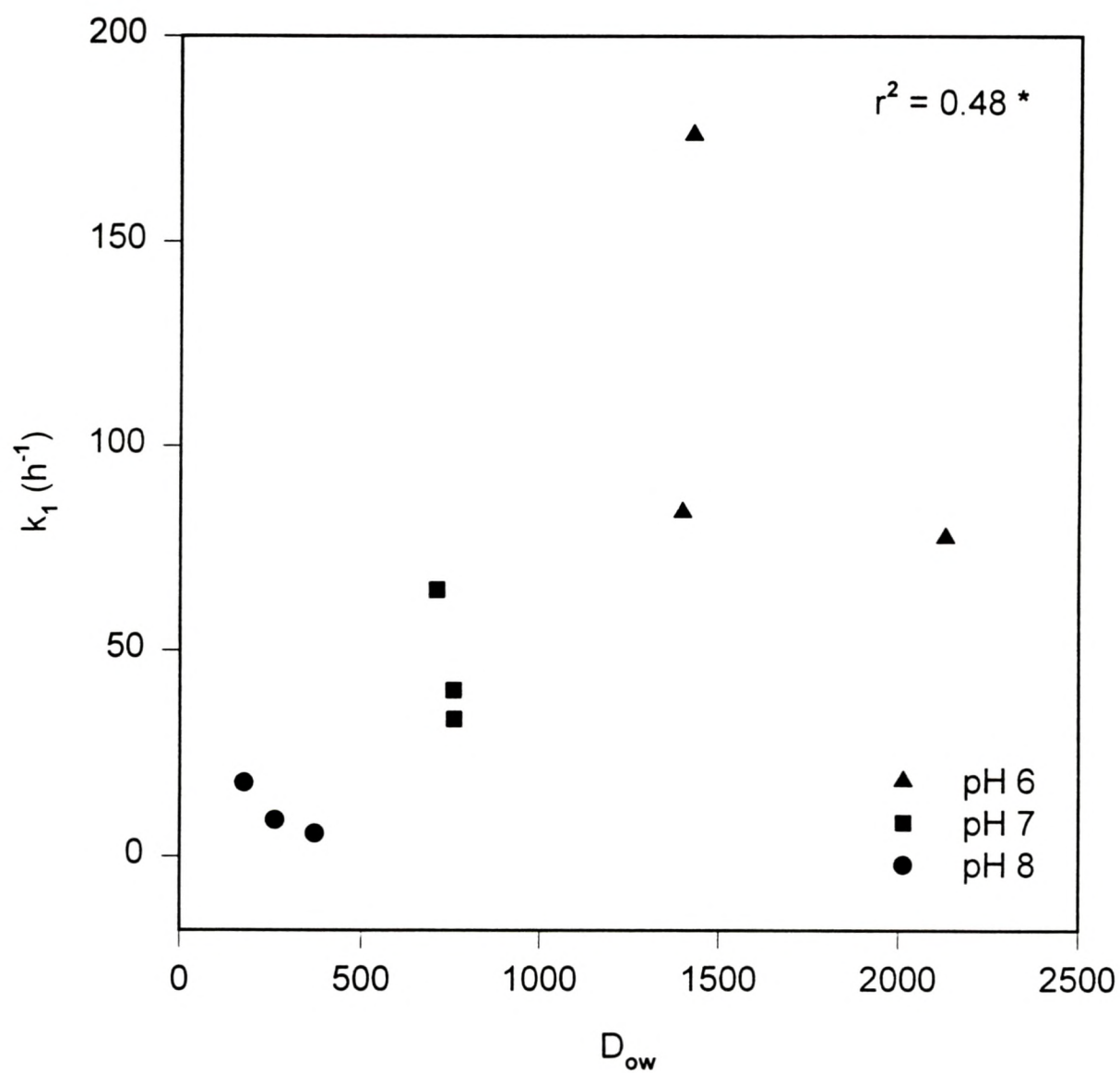
Figuur 24. Verband tussen k_1 en de activiteit van het ongedissocieerde pentachlorofenol



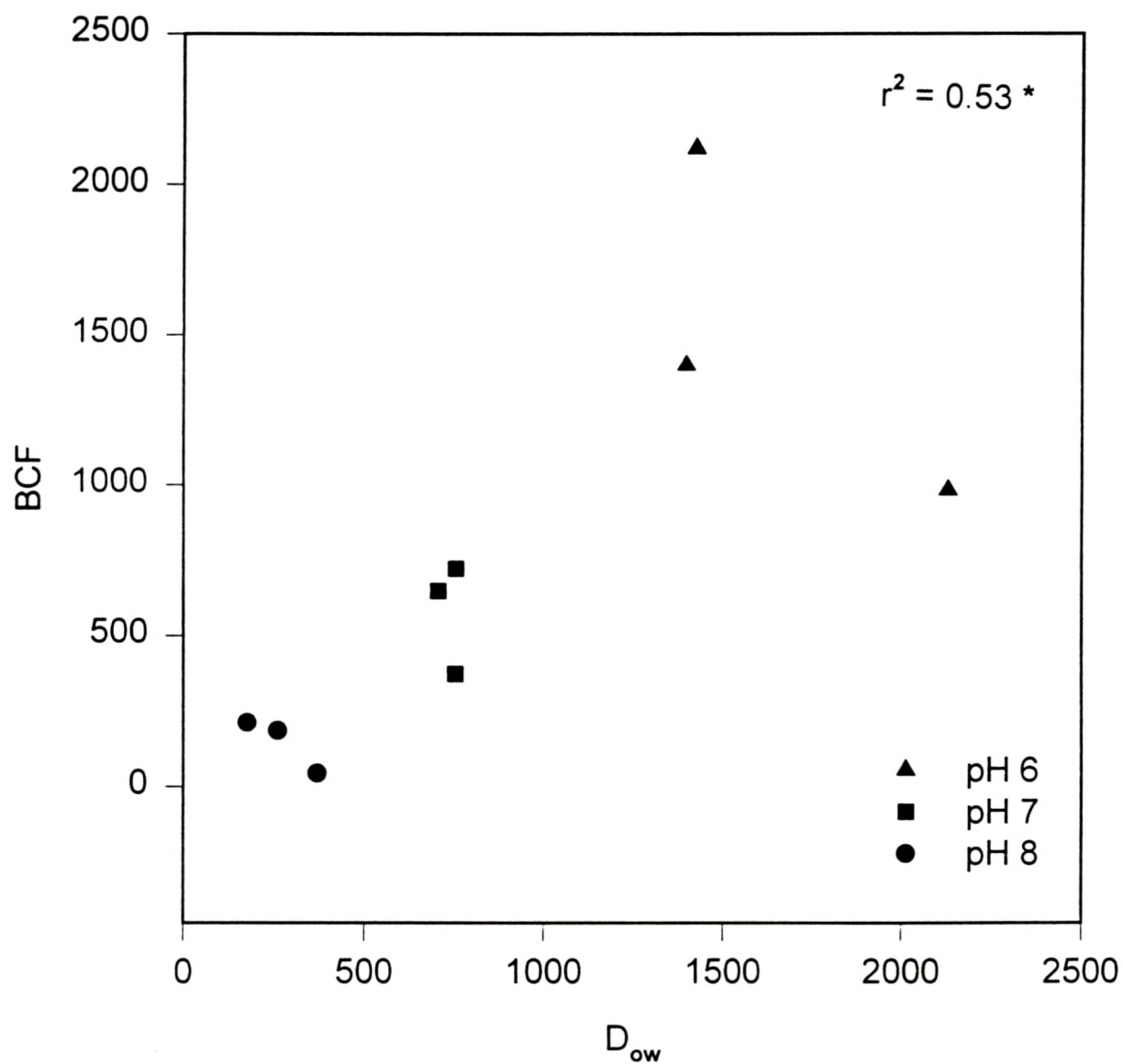
Figuur 25. Verband tussen k_1 en de activiteit van het gedissocieerde pentachlorofenolaat



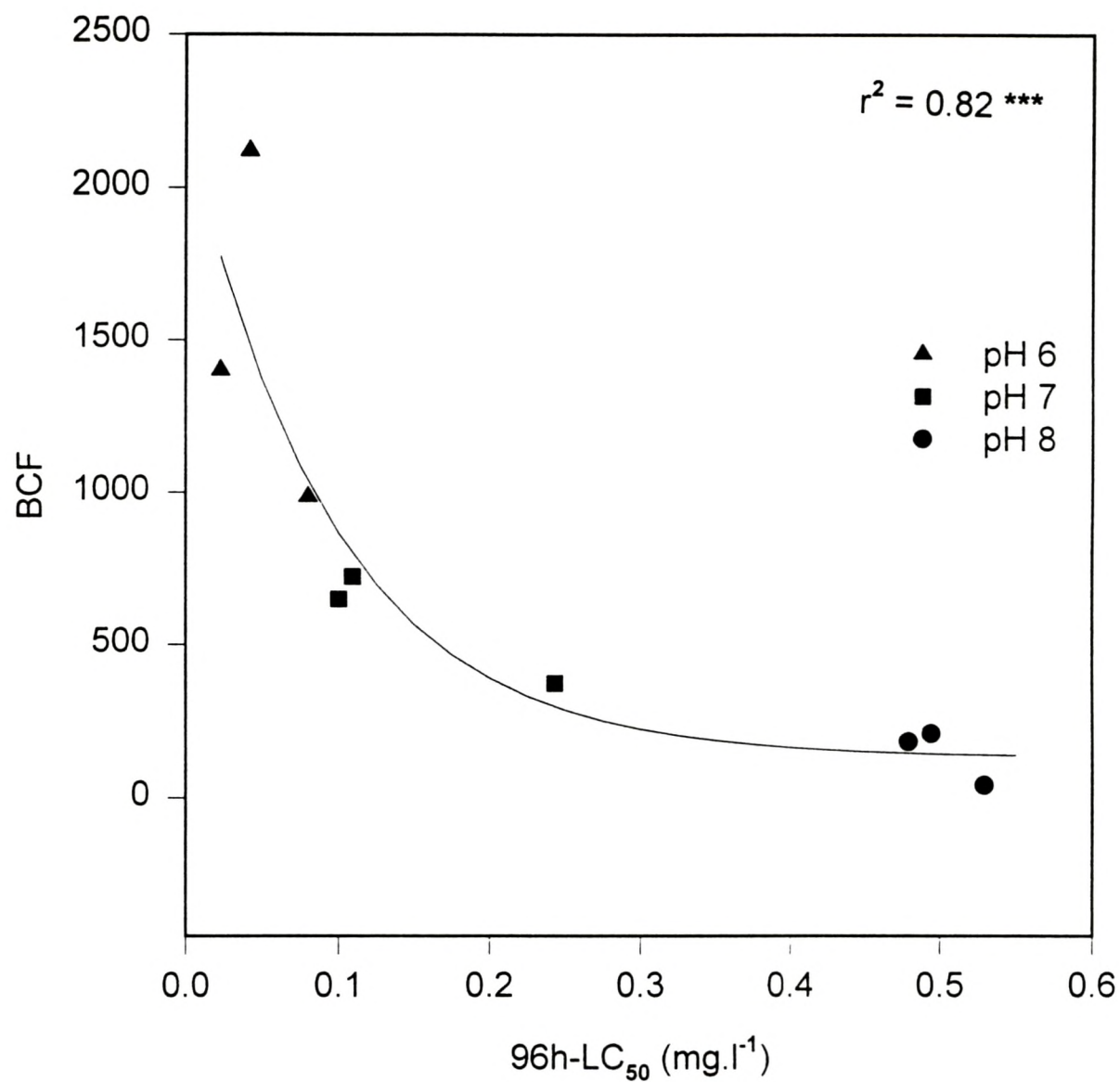
Figuur 26. Verband tussen k_1 en de activiteit van het natriumpentachlorofenolaatcomplex

k_1 - D_{ow} relationship for pentachlorophenol

Figuur 27. Verband tussen k_1 en D_{ow} voor pentachlorofenol

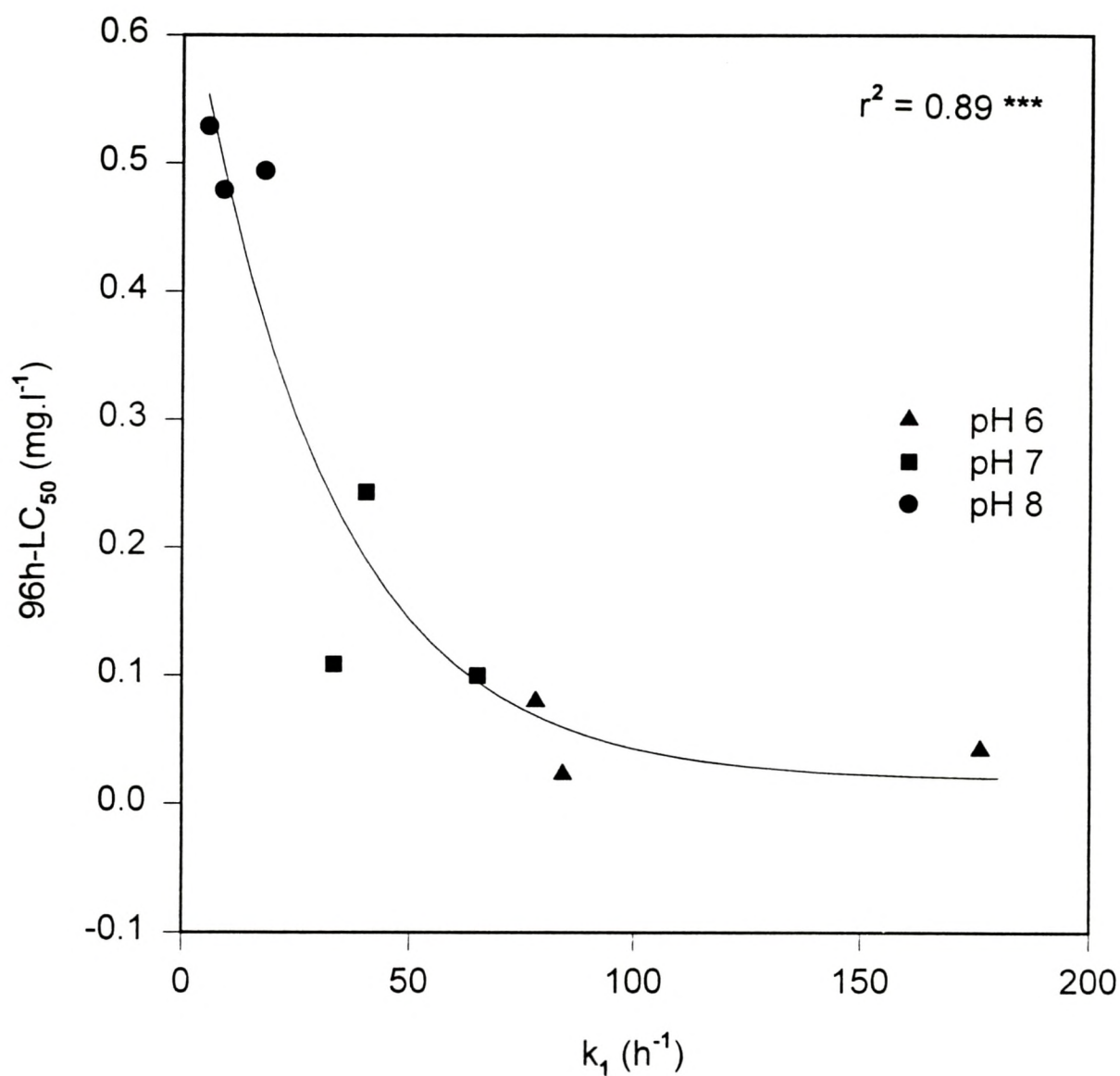
BCF- D_{ow} relationship for pentachlorophenol

Figuur 28. Verband tussen BCF en D_{ow} voor pentachlorofenol

BCF-96hLC₅₀ relationship for pentachlorophenol

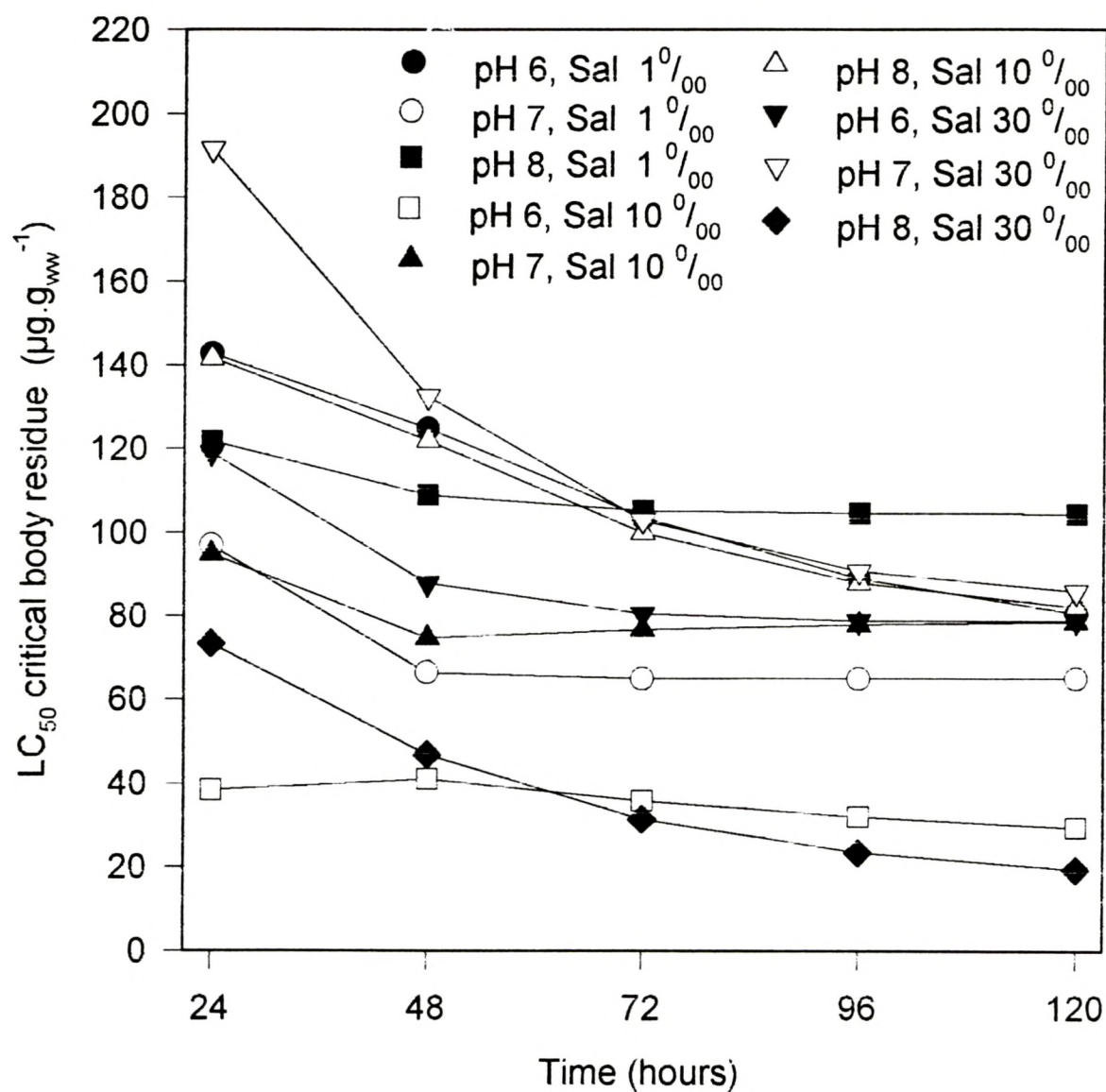
Figuur 29. Verband tussen BCF en 96h-LC₅₀ waarden voor pentachlorofenol

96hLC₅₀-k₁ relationship for pentachlorophenol



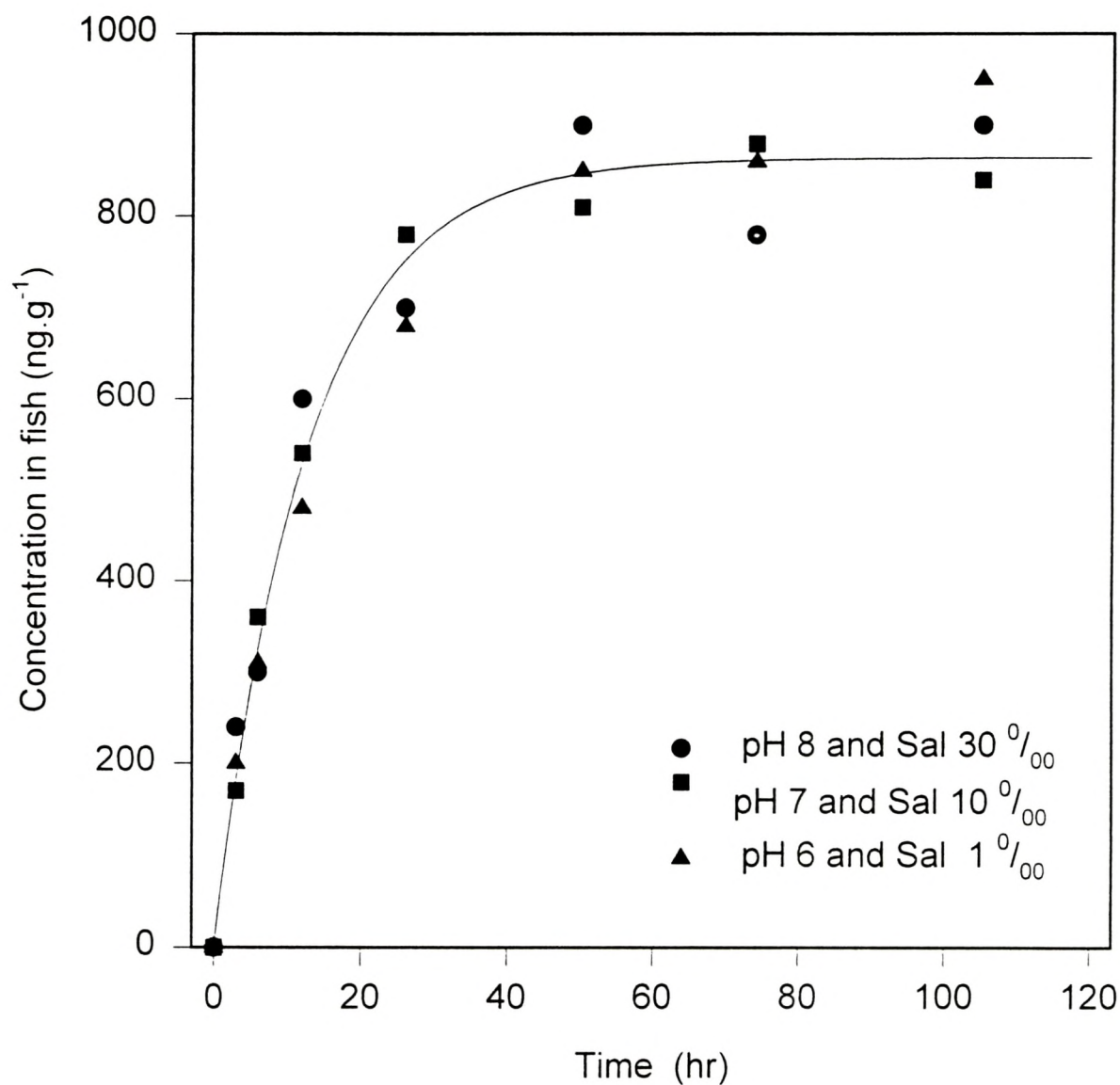
Figuur 30. Verband tussen de 96h-LC₅₀ waarden en k₁ voor pentachlorofenol

LC₅₀ based critical body residues for PCP in sheephead minnow



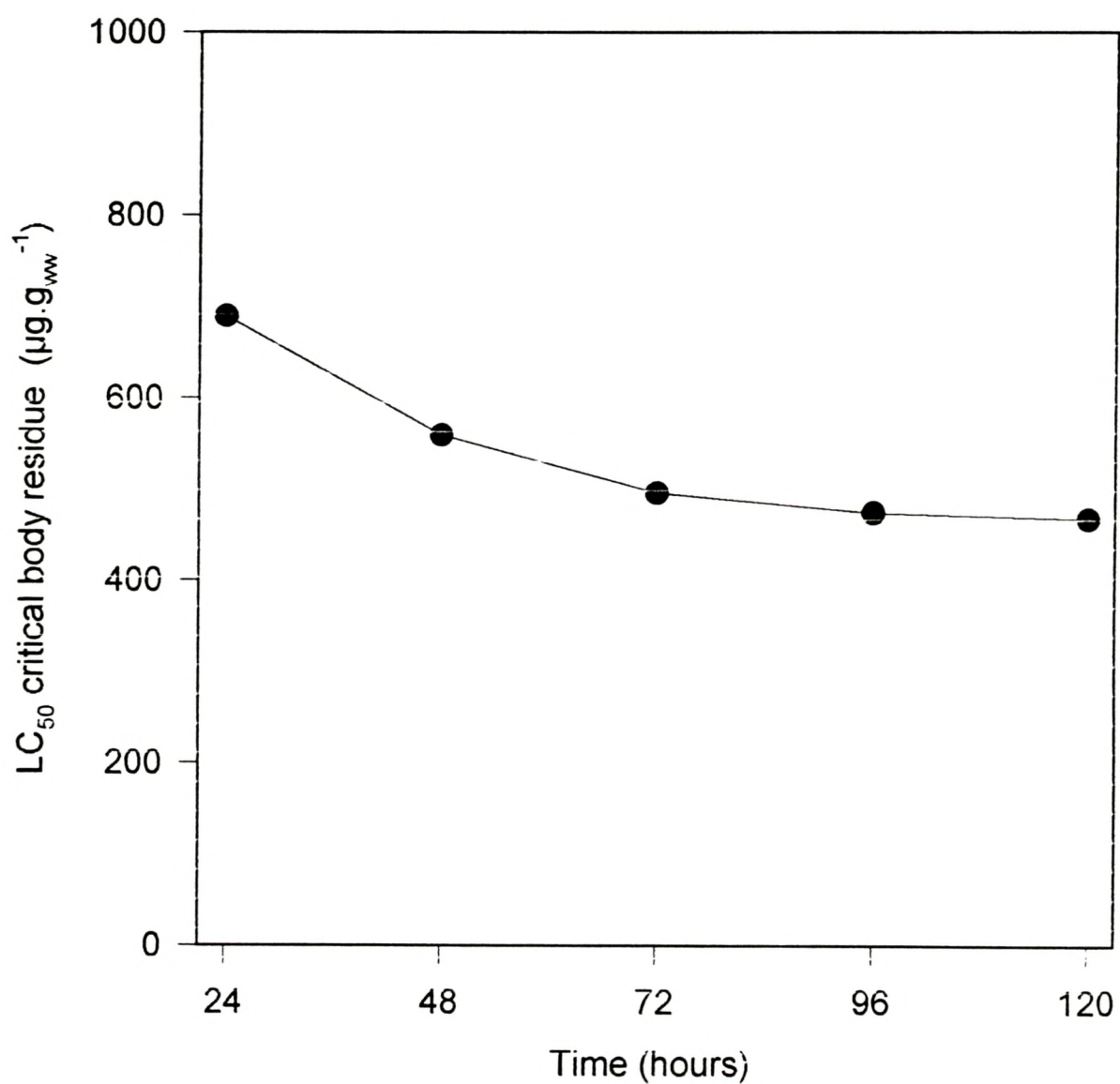
Figuur 31. De op de LC₅₀ gebaseerde kritische lichaamsresidues voor pentachlorofenol bij sheephead minnow

Accumulation of TCB as function of time



Figuur 32. Accumulatie van 1,2,4,-trichlorobenzeen bij 25°C in functie van de tijd bij een blootstellingsconcentratie van 1 $\mu\text{g.l}^{-1}$

LC₅₀ based critical body residues for TCB in sheephead minnow



Figuur 33. De op de LC₅₀ gebaseerde kritische lichaamsresidues voor 1,2,4-trichloro-benzeen bij sheephead minnow

7. BESLUIT

De accumulatie en toxiciteit van 1,2,4-trichlorobenzeen is niet afhankelijk van de gegeven omstandigheden voor de vis die in het kader van deze studie werden onderzocht. Voor pentachlorofenol is de situatie minder éénduidig. Hoewel het duidelijk is dat de speciatie een belangrijke invloed heeft op de accumulatie en toxiciteit van pentachlorofenol, kunnen de effecten niet volledig voorspeld worden op basis van de veranderingen in speciatie. Verschillen in fysiologische conditie van de vissen bij de onderscheiden acclimatisatieomstandigheden spelen hier mogelijk een rol. Het is dan echter niet duidelijk waarom dit een rol zou spelen bij pentachlorofenol en niet bij 1,2,4-trichlorobenzeen. Het is echter wel zo dat bij speciërende verbindingen de speciatie binnenin het organisme een rol zal spelen, dit in tegenstelling met een niet-speciërende verbinding. Een andere belangrijke waarneming is het verschil dat bestaat tussen het effect van speciatie op de octanol-water distributiecoëfficiënt, de toxiciteit en de bioconcentratiefactor. In het eerste geval draagt de vorming van zoutcomplexen bij tot een verhoging van de distributiecoëfficiënten, in de twee laatste gevallen heeft de vorming van zoutcomplexen geen significante invloed en moet rekening gehouden worden met de bijdrage van de gedissocieerde vorm. De vorming van zoutcomplexen resulteert dus waarschijnlijk niet in een verhoging van de accumulatie en toxiciteit van de stof. De vorming van zoutcomplexen met stijgende saliniteit gaat gepaard met een proportionele daling van de activiteiten van de ongedissocieerde vorm. Daar deze vorm makkelijker wordt opgenomen dan de zoutcomplexen, daalt de accumulatie en toxiciteit met stijgende saliniteit.

In sommige omstandigheden is het effect van de saliniteit zeer duidelijk, maar echter nooit groter dan een factor tien. In het geval van pentachlorofenol heeft de verandering van de zuurtegraad een veel sterker effect dan de verandering van de saliniteit. Algemeen is de sterkte en richting afhankelijk van het effect van de zuurtegraad en de saliniteit op de speciatie van de component. Zo zal bij een zwak zure verbinding met een hogere pK_a dan pentachlorofenol het effect van de pH niet zo groot zijn als dat nu het geval is. Componenten met grotere associatieconstanten voor alkali- en aardalkalimetalen zullen dan weer in belangrijkere mate zoutcomplexen vormen dan pentachlorofenol, waardoor de invloed van de saliniteit belangrijker kan worden. Algemeen is echter bekend dat voor dissocieerbare

verbindingen de invloed van de zuurtegraad op de accumulatie en de toxiciteit veel groter en dus belangrijker is dan de invloed van de saliniteit. Bovendien tonen de resultaten aan dat enkel de ongedissocieerde vorm op een significante wijze bijdraagt tot de toxiciteit. Daarenboven gaat een stijging van de saliniteit gepaard met een stijging van de ionische sterkte, waardoor de activiteitscoëfficiënten van de species veranderen. Voor de neutrale species zijn deze effecten klein maar voor de geladen species kunnen ze, afhankelijk van de lading, resulteren in een vrij sterke daling van de activiteit.

Bij de beoordeling van de effecten van de zuurtegraad en de saliniteit, moet ook rekening gehouden worden met het feit dat de experimenten uitgevoerd werden met geacclimatiseerde vissen en met de invloed van de pH en de saliniteit op de fysiologische conditie. Dit hangt in belangrijke mate af van de structurele en functionele organisatie van het organisme (poikilosmotisch stenohalien of euryhalien, homo-osmotisch stenohalien of euryhalien).

Algemeen kan gesteld worden dat de stijging van de saliniteit eerder zal leiden tot de afname van de accumulatie en toxiciteit van een component dan tot een verhoging. Dit betekent dat men in sommige gevallen de normen die gehanteerd worden voor zoet water zou kunnen verzwakken voor zee water. De berekening van deze nieuwe normen voor dissocieerbare verbindingen kan dan gebaseerd worden op de te verwachten veranderingen in de speciatie van de component. Daar er echter gestreefd wordt naar het minimaliseren van de vervuiling van aquatische ecosystemen, lijkt het niet aangewezen om andere normen te hanteren voor zout dan voor zoet water.

8. REFERENCES

Babich and Stotzky (1985). A Microbial Assay for Determining the Influence of Physicochemical Environment Factors on the Toxicity of Organics: Phenol. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 14:409-415

Branson D.R., Blau G.E., Alexander H.C., Neely W.B. (1975). Bioconcentration of 2,2',4,4'-tetrachlorobiphenyl in rainbow trout as measured by an accelerated test. Trans. Am. Fish Soc., 4:785-792

Byrne R.H., Kump L.R. and Cantrell K.J. (1988). The influence of temperature and pH on trace metal speciation in seawater. Mar. Chem., 25:163-181

Chiou C.T., Malcolm R.L., Brinton T.I. and Kile D.E. (1986). Water solubility enhancements of some organic pollutants and pesticides by dissolved humic and fulvic acids. Envir. Sci. Technol., 20:502-507

Connell D.W. and Markwell R. (1992). Mechanism and prediction of nonspecific toxicity to fish using bioconcentration characteristics. Ecotoxicol. Environ. Saf., 24:247-265

Day K.E. (1991). Effects of dissolved organic carbon on accumulation and acute toxicity of fenvalerate, deltamethrin and cyhalothrin to *Daphnia magna* (Straus). Envir. Toxicol. Chem., 10:91-101

De Bruijn J., Busser F., Seinen W. and Hermens J. (1989). Determination of octanol/water partition coefficients for hydrophobic organic chemicals with the "slow-stirring" method. Environmental Toxicology and Chemistry, 8:499-512

Demianov P., De Stefano C., Gianguzza A. and Sammartano S. (1995). Equilibrium studies in natural waters: speciation of phenolic compounds in synthetic seawater at different salinities. Environmental Toxicology and Chemistry, 15:767-773

Deuticke B. (1977). Properties and structural basis of simple diffusion pathways in the erythrocyte membrane. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 78:1

Dickson A. G. and Whitfield M. (1981). An ion-association model for estimating acidity constants (at 25°C and 1 atm pressure) in electrolyte mixtures related to seawater (ionic strength 1 mol.kg⁻¹). *Mar. Chem.* 10:315-333

Dively J. L., Mudge J. E., Neff W.H. and Anthony A. (1977). Blood pO₂, pCO₂ and pH changes in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) exposed to sublethal levels of acidity. *Comp. Biochem. Physiol.* 57A:347

EPA (1993). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. EPA, ed. Weber, C.I., Ohio, fourth edition

Esser H.O. and Moser P. (1982). An appraisal of problems related to the measurement and evaluation of bioaccumulation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 6:131-148

Faust B.C. (1992). The octanol/water distribution coefficients of methylmercuric species: the role of aqueous-phase chemical speciation. *Environ. Toxicology and Chemistry*, 11:1373-1376

Ginzburg, G. (1976). Calculation of all equilibrium concentrations in a system of competing complexation. *Talanta*, 23:142-149

Goodrich M.S., Dulak L.H., Friedman M.A. and Lech J.J. (1991). Acute and long-term toxicity of water-soluble cationic polymers to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and the modification of toxicity by humic acid. *Envir. Toxicol. Chem.*, 10:509-515

Harned H.S. and Owen B.B., *The physical chemistry of electrolyte solutions*, Reinhold, New York, 1958

Hayton W.L., Barron M.G. (1990). Rate limiting barriers to xenobiotic uptake by the gill.

Environ. Toxicol. Chem. 9:151-157

Hogben C.A.M., Tocco D.J., Brodie B.B. and Schanker L.S. (1959). On the mechanism of intestinal absorption of drug. J. Pharmacol. Exp. Ther. 125:275-282

Holcombe G.W., Fiandt J.T. and Phipps G.L. (1980). Effects of pH increases and sodium chloride additions on the acute toxicology of 2,4-dichlorophenol to the fathead minnow. Water Research, 14:1073-1077

Howe G.E., Marking L.L., Bills T.D., Rach J.J. and Mayer F.L. (1994). Effects of water temperature and pH on toxicity of terbufos, trichlorfon, 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol to the amphipod *Gammarus pseudolimnaeus* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Environmental Toxicology and Chemistry, 13, 51-66

Jafvert C.T., Westall J.C., Grieder E. and Schwarzenbach R.P. (1990). Distribution of hydrophobic ionogenic organic compounds between octanol and water: organic acids. Environ. Sci. Technol., 24:1795-1803

Johnson C.A. and Westall J.C. (1990). Effect of pH and KCl concentration on the octanol-water distribution of methylanilines. Environmental Science and Technology, 24, 12:1869-1875

Jollow D.J., Brodie B.B. (1972). Mechanisms of drug absorption and drug solution. Pharmacology 8:21-32

Kaiser K.L.E. and Valdmanis I. (1982). Apparent octanol/water partition coefficients of pentachlorophenol as a function of pH. Can. J. Chem., 60:2104-2106

Kishino T. and Kobayashi K. (1995). Relation between toxicity and accumulation of chlorophenols at various pH, and their absorption mechanism in fish. Wat. Res. 29:431-442

Kukkonen J., Oikari A., Johnsen S. and Gjessing E. (1989). Effects of humus concentration

on benzo(a)pyrene accumulation from water to *Daphnia magna*: comparison of natural waters and standard preparations. *Sci. Total Envir.*, 79:197-207

Kobayashi K. and Akitake H. (1975). Studies on the metabolism of chlorophenols in fish -I. Absorption and excretion of PCP by goldfish. *Nippon Suisan Gakkaishi*. 41:87-92

Kobayashi K. (1978). Metabolism of pentachlorophenol in fishes. In: Rao K. R. (ed.), *Pentachlorophenol: Chemistry, Pharmacology, and Environmental Toxicology*. New York and London: Plenum Press

Leversee G.J., Landrum P.F., Giesy J.P. and Tannin T. (1983). Humic acids reduce bioaccumulation of some polycyclic aromatic hydrocarbons. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 40:63-69

Lydy M.J., Bruner K.A., Fry D.M. and Fisher S.W. (1990). Effects of sediment and the route of exposure on the toxicity and accumulation of neutral lipophilic and moderately water-soluble metabolizable compounds in the midge *Chironomus riparius*. In: Landis WG, van der Scalie WH, (eds), *Aquatic toxicology and risk assessment: Thirteenth volume:ASTM STP 1096*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 140-164

Mackay D. (1982). Correlation of bioconcentration factors. *Environ. Sci. Technol.* 16:274-278

Major M.A., Rosenblatt D.H. and Bostian K.A. (1991). The octanol/water partition coefficient of methylmercuric chloride and methylmercuric hydroxide in pure water and salt solutions. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10:5-8

McCarthy J.F., Jimenez B.D. and Barbee T. (1985). Effect of dissolved humic material on accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons: structure-activity relationship. *Aquat. Toxic.*, 7:15-24

McCarthy L.S., Mackay D., Smith A.D., Ozburn G.W. and Dixon D.G. (1992). Residue-

based interpretation of toxicity and bioconcentration QSAR's from aquatic bioassays: neutral narcotic organics. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11:917-930

McWilliams P.G. and Potts W.T.W. (1978). The effects of pH and calcium concentrations on gill potentials in the brown trout, *Salmo trutta*. *J. Comp. Physiol.* 126:277

Neilson A.H., Allard A.-S., Fischer S., Malmberg M. and Viktor T. (1990). Incorporation of a subacute test with zebra fish into a hierarchical system for evaluating the effect of toxicants in the aquatic environment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 20:82-97

Nordlie F.G. (1987). Plasma osmotic Na⁺ and Cl⁻ regulation under euryhaline conditions in *Cyprinodon variegatus* Lacepede. *Comp. Biochem. Physiol. A*, 86A(1):57-61

OECD Guidelines for testing of chemicals (1995). Organisation for economic co-operation and development

Pärt P. (1989). Bioavailability and uptake of xenobiotics by aquatic organisms. In: *Chemicals in the Aquatic Environment*. (L. Landner, Ed.), Springer-Verlag, p. 113-127

Pärt P. (1990). The perfused fish gill preparation in studies of the bioavailability of chemicals. *Ecotoxicol. and Environ. Safety*, 19:106-115

Ribo J.M. (1988). The octanol/water partition coefficient of the herbicide chlorsulfuron as a function of pH. *Chemosphere*, 17, 4, 709-715

Saarikoski J., Lindström, Tyynelä M. and Viluksela M. (1986). Factors affecting the absorption of phenolics and carboxylic acids in the Guppy (*Poecilia reticulata*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 11:158-173

Saarikoski J. and Viluksela M. (1981). Influence of pH on the toxicity of substituted phenols to fish. *Arch. Environm. Contam. Toxicol.*, 10:747-753

Setschenow J. (1889). Über die Konstitution der Salzlösungen auf Grund ihres Verhaltens zu Kohlensäure. Z. Phys. Chem., Vierter Band, 1:117-125

Shore P.A., Brodie B.B. and Hogben C. A. M. (1957). The gastric secretion of drugs: A pH partition hypothesis. J. Pharmacol. exp. Ther. 119:361

Simpson D.G. en Gunter G. (1956). Notes on habitat, systematics characters, and life histories of Texas salt water cyprinodontes. Tulane Stud. Zool., 4:113-134

Smith R.M. and Martell A.E. (1989). Critical Stability Constants. Vol 6. Second Supplement. Plenum Press, New York

Sposito G. and Traina S.J. (1987). An ion-association model for highly saline, sodium-chloride dominated waters. J. Environ. Qual. 16 (1):80-85

Stehly G.R. and Hayton W.L. (1990). Effect of pH on the accumulation kinetics of pentachlorophenol in goldfish. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 19:464-470

Steinberg C.E.W., Xu Y., Lee S.K., Freitag D. and Kettrup A.A. (1993). Effect of dissolved humic material (DHM) on bioavailability of some organic xenobiotics to *Daphnia magna*. Chemical Speciation and Bioavailability, 5(1):1-9

Tachikawa M., Sawamura R., Okada S. and Hamada A. (1991). Differences between freshwater and seawater killifish (*Oryzias latipes*) in the accumulation and elimination of pentachlorophenol. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 21:146-151

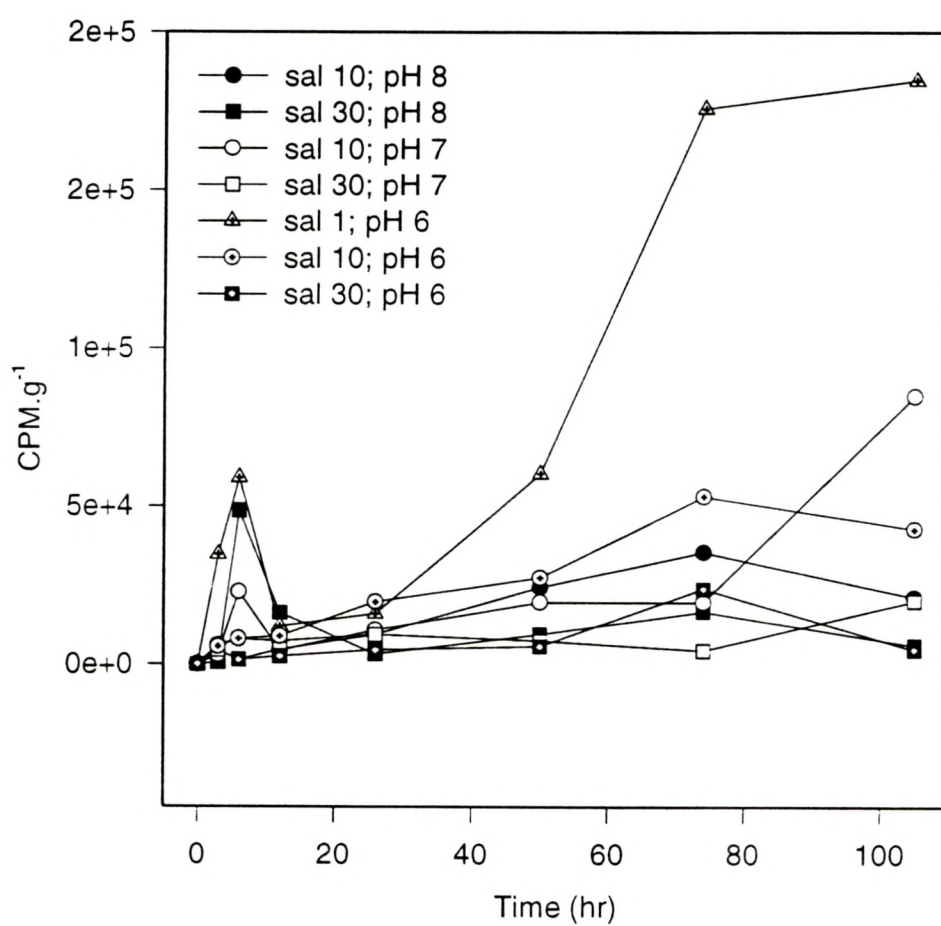
Tas J.W. (1993). Fate and effects of triorganotins in the aqueous environment. Bioconcentration kinetics, lethal body burdens, sorption and physico-chemical properties. Proefschrift Universiteit Utrecht

Tomlin C. (1994). The Pesticide Manual. Incorporating The Agrochemicals Handbook. The Royal Society of Chemistry, United Kingdom, Tenth Edition, 1341 pgs.

- Trujillo D. A., Ray L. E., Murray H. E., Giam C.S. (1982). Bioaccumulation of pentachlorophenol by killifish (*Fundulus similis*). *Chemosphere* 11:25-31
- Tsuda T., Aoki S., Kojima M. and Harada H. (1990a). The influence of pH on the accumulation of tri-n-butyltin chloride in carp. *Comp. Biochem. Physiol.* 95C:151-153
- Tsuda T., Aoki S., Kojima M. and Harada H. (1990b). Difference between freshwater and seawater-acclimated guppies in the accumulation and excretion of tri-n-butyltin chloride and triphenyltin chlorid. *Wat. Res.*, 24:1373-1376
- Turner D.R., Whitfield M. en Dickson A.G. (1981). The equilibrium speciation of dissolved components in freshwater and seawater at 20°C and 1 atm. pressure. *Geochim. Cosmochim. Acta*, 45:855-881
- van Straalen (1991). Opnamekinetiek en interne verdeling. In: *Leerboek Oecotoxicologie*. van Straalen N.M. en Verkleij J.A.C. (eds.), VU Uitgeverij Amsterdam. 422 pg.
- Versteeg D.J. and Shorter S.J. (1992). Effect of organic carbon on the uptake and toxicity of quaternary ammonium compounds to the fathead minnow, *Pimiphales promelas*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11:571-580
- Weidenhaupt A.N.J. (1994). Tralkylzinnverbindungen: Speziierung im Oktanol/Wasser-System, Sorption an Mineraloberflächen. Thesis, 102 p.
- Westall J.C., Leuenberger C. and Schwarzenbach R. (1985). Influence of pH and Ionic Strength on the Aqueous-Nonaqueous Distribution of Chlorinated Phenols. *Environ. Sci. Technol.*, 19:193-198
- Wright E. M. and Diamond J.M. (1968). Effects of pH and polyvalent cations on the selective permeability of gall-bladder epithelium to monovalent ions. *Biochim. Biophys. Acta* 163:57

BIJLAGE 1. Accumulatie van diquat in functie van de tijd

Accumulation of diquat as function of time



BIJLAGE 2. Concentratie van diquat in het water in functie van de tijd

Concentration of diquat in water as function of time

